

**IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI
PADA SALIVA ANJING (*Canis lupus*)
RAS HERDER DEWASA**



Skripsi

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih Gelar
Sarjana Sains Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi
Pada Fakultas Sains Dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar

Oleh:

NIRWANA

NIM: 60300114010

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UIN ALAUDDIN MAKASSAR
2018**

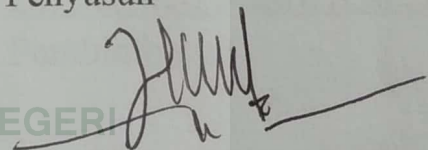
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nirwana
NIM : 60300114010
Tempat/ Tgl. Lahir : Lanniti labuaja, 28 Agustus 1996
Jur/Prodi : Biologi
Fakultas : Sanins dan Teknologi
Alamat : Desa Rompegading, Kec. Cenrana, Kab. Maros
Judul : Identifikasi Molekuler Bakteri pada Saliva Anjing (*Canis lupus*) Ras Herder Dewasa

Menyatakan dengan sesungguhnya dan penuh kesadaran bahwa skripsi ini benar adalah atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya, maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

Samata, Agustus 2018
Penyusun



Nirwana

NIM: 60300114010

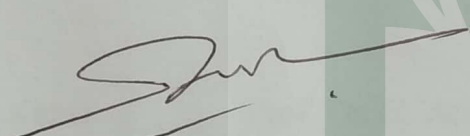
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

PERSETUJUAN PEMBIMBING

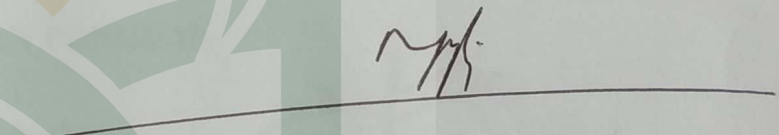
Pembimbing penulisan skripsi Saudari **Nirwana**, NIM: 60300114010, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, setelah meneliti dan mengoreksi dengan seksama skripsi berjudul, “Identifikasi Molekuler Bakteri pada Saliva Anjing (*Canis lupus*) ras Herder Dewasa”, memandang bahwa skripsi tersebut telah memenuhi syarat-syarat ilmiah dan dapat disetujui untuk diajukan ke sidang Munaqasyah.

Demikian persetujuan ini diberikan untuk diproses lebih lanjut.

Samata, Agustus 2018



Dr. Fatmawati Nur, S.Si., M.Si..
Pembimbing II



Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes.
Pembimbing I

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul, "Identifikasi Molekuler Bakteri pada Saliva Anjing (*Canis lupus*) ras Herder Dewasa", yang disusun oleh Nirwana, NIM: 60300114010, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, telah diuji dan dipertahankan dalam sidang *munaqasyah* yang diselenggarakan pada hari Senin, tanggal 16 Agustus 2018 M, bertepatan dengan 04 Zulhijjah 1439 H, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana dalam Ilmu Sains dan Teknologi, Jurusan Biologi (dengan beberapa perbaikan).

Samata, 16 Agustus 2018 M.
04 Zulhijjah 1439 H.

DEWAN PENGUJI:

Ketua : Prof. Dr. H. Arifuddin M.Ag. (.....)

Sekretaris : St. Aisyah Sijid, S.Pd., M. Kes. (.....)

Munaqisy I : Eka Sukmawaty, S.Si., M.Si. (.....)

Munaqisy II : Dr. M. Thahir Maloko, M. THi (.....)

Pembimbing I : Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes. (.....)

Pembimbing II: Dr. Fatmawati Nur, S.Si., M.Si. (.....)

Diketahui oleh:

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar,



Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag.

NIP. 19601205 199303 1 001

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Segala puji atas kebesaran Sang Khalik yang telah menciptakan alam semesta dalam suatu keteraturan hingga dari lisan terpercik berjuta rasa syukur kehadiran Allah swt karena atas limpahan Rahmat, Hidayah dan Karunia-Nyalah sehingga saya diberikan kekuatan, kesempatan dan kemudahan kepada hamba-Nya untuk menyelesaikan tugas akhir (skripsi) ini yang berjudul **“Identifikasi Molekuler Bakteri Pada Saliva Anjing (*Canis lupus*) Ras Herder Dewasa”** dapat diselesaikan dengan baik sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.

Shalawat dan Salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Baginda Besar Nabi Muhammad saw, kepada keluarganya, para sahabatnya, hingga pada umatnya hingga akhir zaman ini yang di utus ke permukaan bumi ini untuk menuntun manusia dari lembah kebiadaban menjadi kebaikan seperti sekarang ini yang menjadi suri tauladan/uswatun hasanah bagi kita semua..

Pertama-tama penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang dalam dan tulus kepada kedua orang tua penulis yakni ayahanda Muhammad Anar dan ibunda Nurbaya yang senantiasa merawat dan mendidik penulis dari kecil hingga sekarang. Terutama bagi ibu penulis semoga Allah senantiasa memberikan tempat terbaik. Penulis menyadari bahwa ucapan terima kasih penulis tidak sebanding dengan pengorbanan yang dilakukan oleh keduanya. Untuk ayahanda tercinta, pengertian,

motivasi dan doa yang selalu engkau panjatkan senantiasa penulis ingat, kagumi dan hargai.

Selanjutnya, penulis sudah sepatutnya menyampaikan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Musafir Pabbari, M.Si., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
2. Bapak Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar. beserta Wakil Dekan I, II dan III, dan seluruh staf administrasi yang telah memberikan berbagai fasilitas kepada kami selama masa pendidikan.
3. Bapak Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes selaku ketua jurusan Biologi serta pembimbing I dalam penulisan skripsi yang telah meluangkan waktunya sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan, serta sekretaris Jurusan Biologi atas segala ilmu, petunjuk serta arahnya selama berkuliah di UIN Alauddin.
4. Ibu Dr. Fatmawati Nur, S.Si., M.Si selaku pembimbing II dalam penulisan skripsi yang senantiasa menyisihkan sedikit waktu-waktunya yang berharga untuk membimbing penulis. Saran-saran serta kritik-kritik mereka sangat bermanfaat dalam merampungkan skripsi ini.
5. Ibu Eka Sukmawaty, S.Si., M.Si selaku pembahas I, dan Bapak. Dr. M. Thahir Maloko, M.Thi selaku pembahas II.
6. Bapak dan Ibu dosen dalam jajaran Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar yang selama ini telah mendidik penulis dengan baik, sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikannya pada tingkat perguruan tinggi.

7. Bapak dan ibu pegawai Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin (RSP UNHAS) yang senantiasa membimbing selama penelitian berlangsung.
8. Kepada Kepala Laboratorium di Jurusan Biologi Ibu Eka Sukmawaty, S.Si., M.Si dan beserta staf Laboran Ibu Faridah Ahmad, S.Pd. Kepala Laboratorium Genetika dan Molekuler, Ibu Syamsidar, S.Si. Kepala Laboratorium Zoologi, Ibu Kurniati, S. Si., Kepala Laboratorium Mikrobiologi, Kak Zulkarnain, S.Si Kepala Laboratorium Botani yang senantiasa membimbing kami praktikum di Laboratorium selama perkuliahan berlangsung hingga penulis bisa menyelesaikan tugas akhirnya.
9. Kepada Kak Sumiati selaku Staf di Jurusan Biologi yang sangat membantu dalam penyelesaian tugas akhir penulis. Senantiasa meluangkan waktunya, baik dalam hal peminjaman buku, mengurus persuratan dan sebagainya.
10. Kepada saudara dan saudari dari ibu dan ayah saya Tante, Paman, sepupu dan nenek, yang senantiasa memberikan semangat dan do'a kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir.
11. Kepada Kak Yusuf Usman sebagai alumni biologi dan sebagai Staff laboratorium yang senantiasa telah meluangkan waktunya untuk membantu dan mengajari penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir.
12. Saudara seperjuanganku Nurul Afriani Arif, Fitria Ramadhana, Almik Agri Lestari dan Zulfiana Machmud yang senantiasa berjuang sama-sama, saling memberikan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir.

13. Kepada teman se-Angkatan (LACTEAL) yang senantiasa memberikan semangat dan do'a kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir.
14. Adik-adik mahasiswa jurusan Biologi 2015, 2016, dan 2017 serta para senior Biologi.
15. Teman-teman KKN-57 di Kabupaten Bantaeng, Kecamatan Sinoa, khususnya di Desa Bonto Majannang yang selalu memberikan dukungan, motivasi, semangat, dan doanya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhirnya.
16. Serta semua pihak yang telah membantu dalam penulisan tugas akhir ini yang tidak dapat dituliskan satu persatu.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada kepala perpustakaan UIN Alauddin Makassar beserta staf-stafnya sehubungan dengan pengumpulan bahan-bahan untuk membuat skripsi ini.

Pada kenyataannya, walaupun menerima banyak bantuan dari berbagai pihak, pada dasarnya yang bertanggung jawab terhadap tulisan ini adalah penulis sendiri. Terakhir penulis harus sampaikan penghargaan kepada mereka yang membaca dan berkenan memberikan saran, kritikan atau bahkan koreksi terhadap kekurangan dan kesalahan yang pasti masih terdapat dalam skripsi ini. Semoga karya yang sangat sederhana ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Samata, Agustus 2018

Nirwaana
NIM: 60300114010

DAFTAR ISI

SAMPUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	ii
PERSETUJUAN PEMBIMBING.....	iii
PENGESAHAN SKRIPSI	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR ILUSTRASI	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1-7
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Ruang Lingkup Penelitian.....	5
D. Kajian Pustaka/Penelitian Terdahulu	6
E. Tujuan Penelitian	6
F. Kegunaan Penelitian.....	7
BAB II KAJIAN TEORITIS.....	8-28
A. Ayat yang relevan	8
B. Tinjauan Umum Anjing Herder	9
C. Tinjauan Umum air liur Anjing	13
D. Tinjauan Umum Bakteri.....	14
E. Tinjauan Biologi Molekuler	19
F. Kerangka Pikir	28

BAB III METODE PENELITIAN.....	29-36
A. Jenis dan Pendekatan Penelitian.....	29
B. Variabel Penelitian.....	29
C. Definisi Operasional Variabel.....	29
D. Instrumen Penelitian (Alat dan Bahan).....	30
E. Prosedur Kerja.....	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	36-61
A. Hasil Penelitian	36
B. Pembahasan	53
BAB V PENUTUP.....	54-55
A. Kesimpulan	54
B. Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56-61
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	62-75
RIWAYAT HIDUP.....	76

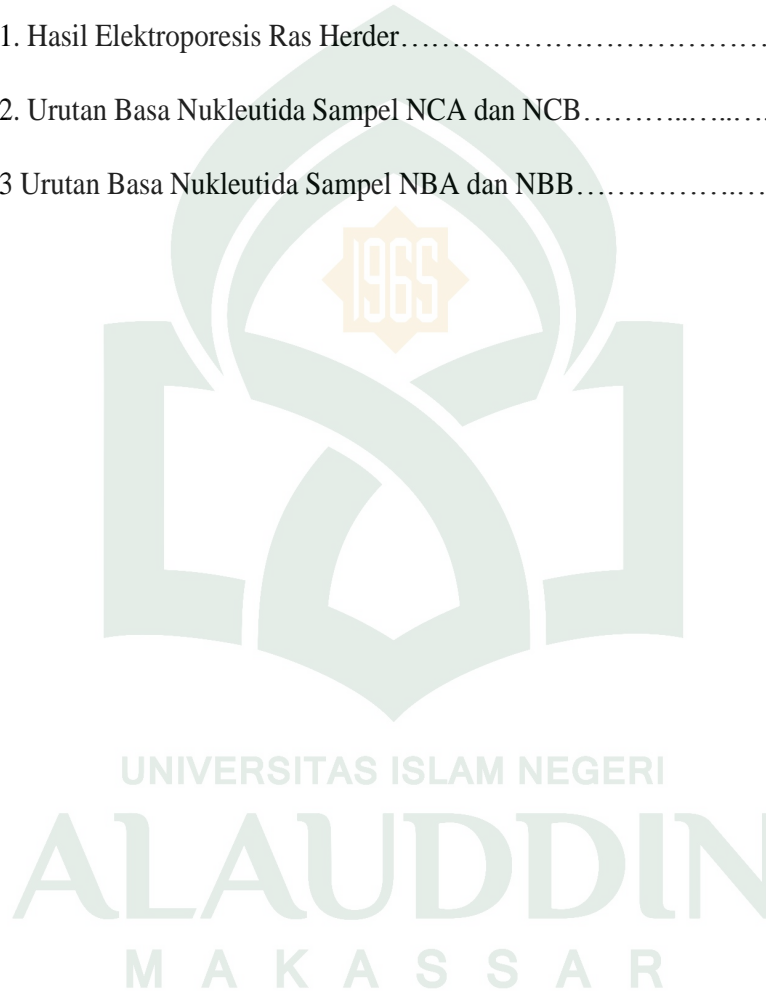
DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Komposisi Primer Mix	34
Table 4.1 Bakteri hasil BLAST Sampel NCA dan NCB	39
Table 4.1 Bakteri hasil BLAST Sampel NBA dan NBB	42



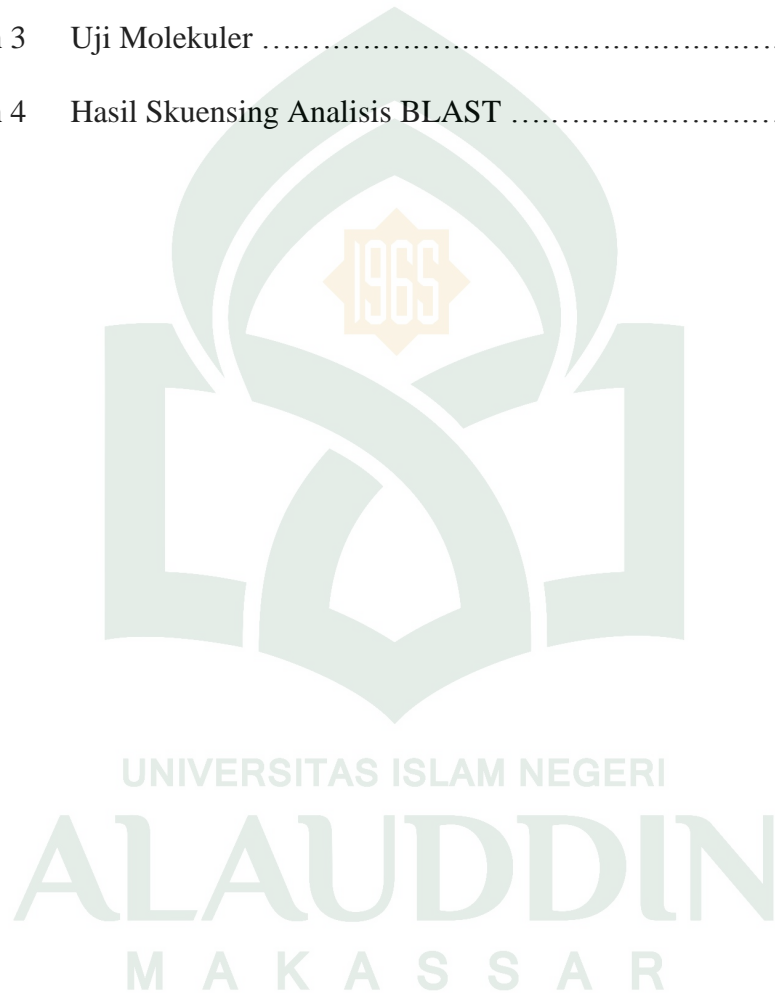
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Anjing (<i>Canis lupus</i>) Ras Herder.....	13
Gambar 2.2. ilustrasi amplifikasi pada PCR.....	25
Gambar 4.1. Hasil Elektroporesis Ras Herder.....	18
Gambar 4.2. Urutan Basa Nukleotida Sampel NCA dan NCB.....	37
Gambar 4.3 Urutan Basa Nukleotida Sampel NBA dan NBB.....	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema kerja
Lampiran 2	Proses Pengambilan Sampel
Lampiran 3	Uji Molekuler
Lampiran 4	Hasil Skuensing Analisis BLAST



ABSTRAK

Nama : NIRWANA
NIM : 60300114010
Judul Skripsi : IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI PADA
SALIVA ANJING (*Canis lupus*) RAS HERDER
DEWASA

Identifikasi molekuler melalui tiga tahap utama yaitu ekstraksi, amplifikasi dan elektroforesis. Penelitian ini menerapkan penelitian kualitatif dengan pendekatan eksploratif untuk mengetahui jenis bakteri pada saliva anjing (*Canis lupus*) ras Herder dewasa. Penelitian ini menggunakan primer 16S rRNA. Untuk analisa *sequence alignment*, dilakukan dengan membandingkan sekuens yang di peroleh (*query*) dengan yang telah ada pada *Gene Bank* dengan *Database searches* NCBI *internet* menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Hasil analisis BLAST dari keempat sampel yaitu pada sampel NCA adalah bakteri *Hydrogenophage* sp. Pada sampel NCB terdapat bakteri *Prevotella* sp. Kemudian pada sampel NBA terdapat bakteri *Serratia masecenscens*, sedangkan pada sampel NBB terdapat bakteri *Bergeyella zoohelcum*.

Kata kunci: Identifikasi Molekuler, Herder, Bakteri Patogen, Saliva anjing (*Canis lupus*).

ABSTRACT

Name: NIRWANA
Student ID Number : 60300114010
Detitle Of Essay : IDENTIFICATION OF MOLECULAR BACTERIA
IN SALIVA DOG (*Canis lupus*) ADULT HERDER
RACE

Molecular identification through three main stages of extraction, amplification and electrophoresis. This research uses qualitative research with explorative approach to know the type of bacteria in the adult Herder race (*Canis lupus*) dog saliva. This study uses 16S rRNA primers. For sequence alignment analysis, it is done by comparing the sequence obtained (query) with those already in the Gene Bank with the NCBI internet searches database using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). The results of BLAST analysis of the four samples in the NCA sample were *Hydrogenophage* sp. In the NCB sample there were *Prevotella* sp bacteria. Then in the NBA sample there was *Serratia masecenscens*, while in NBB samples *Bergeyella zoohelcum*.

Keywords: Molecular identification, Herder, Pathogenic bacteria saliva dog (*Canis lupus*).

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Anjing merupakan salah satu hewan mamalia dan merupakan hewan peliharaan yang paling di sukai dan bermanfaat bagi manusia. Anjing adalah salah satu hewan peliharaan yang cukup populer, baik sebagai penjaga rumah maupun menjadi 'teman baik manusia'. Bahkan anjing menjadi salah satu hewan yang masuk ke dalam unit pelacak di kepolisian (Hasromoyo, 2008). Sebagaimana dijelaskan dalam QS. al-Maidah/5: 4 yang berbunyi:

يَسْأَلُونَكَ مَاذَا أُحِلَّ لَهُمْ قُلْ أُحِلَّ لَكُمْ الْطَّيِّبَاتُ وَمَا عَلَّمْتُم مِّنَ الْجَوَارِحِ
مُكَلِّبِينَ تُعَلِّمُونَهُنَّ مِمَّا عَلَّمَكُمُ اللَّهُ فَكُلُوا مِمَّا أَمْسَكْنَ عَلَيْكُمْ وَاذْكُرُوا
أَسْمَ اللَّهِ عَلَيْهِ وَاتَّقُوا اللَّهَ إِنَّ اللَّهَ سَرِيعُ الْحِسَابِ ﴿٤﴾

Terjemahnya:

Mereka menanyakan kepadamu: "Apakah yang dihalalkan bagi mereka?". Katakanlah: "Dihalalkan bagimu yang baik-baik dan (buruan yang ditangkap) binatang buas yang telah kamu ajar dengan melatih nya untuk berburu; kamu mengajarnya menurut apa yang telah diajarkan Allah kepadamu. Maka makanlah dari apa yang ditangkapnya untukmu, dan sebutlah nama Allah atas binatang buas itu (waktu melepaskannya). dan bertakwalah kepada Allah, Sesungguhnya Allah amat cepat hisab-Nya (Kementerian Agama RI, 2012).

(Menurut Ibnu Katsir, 2004), Firman-Nya, “Dengan melatihnya untuk berburu, “mengandung kemungkinan bahwa kata ini sebagai *haal* (keterangan) dari *dhamiir* (kata ganti) dari kata *allamtm*, sehingga dengan demikian ia menjadi *haal*

dari *faa'il* (pelakunya), dan mengandung kemungkinan juga sebagai *haal* dari *maf'uul* (obyeknya) yaitu *jawaarih*. Artinya, binatang-binatang buas yang kalian latih sehingga menjadi binatang-binatang yang terlatih untuk berburu, yaitu mereka akan menangkap buruannya dengan cakar-cakar atau kuku-kukunya.

Pada ayat tersebut menjelaskan tentang binatang buas yang dilatih. Contohnya anjing yang memiliki manfaat walaupun di kalangan ummat Muslim dilarang untuk bersentuhan dengan anjing tetapi bisa diteliti terutama di bidang ilmu Biologi. seperti yang tidak terlihat dengan kasat mata contohnya bakteri yang terdapat pada air liur anjing, sehingga perlu untuk diteliti. Maka Maha besar dan Maha Kuasa Allah swt. atas segala ciptaannya di muka bumi ini.

Anjing berasal dari keluarga yang sama dengan serigala, *coyote* dan musang. Ia boleh ditemui di seluruh pelusuk dunia samada di kawasan bandar, kampung dan hutan Anjing memiliki rupa umum yang mudah dikenal yaitu bertubuh tegap berotot, badan dan ekor berbulu, berkaki empat, lidah terjelir dan telinga besar (Anne Hillyard, *et al.* 2001). Dari segi warna, terdapat berbagai variasi warna anjing dari hitam ke putih, merah, kelabu dan perang. Anjing memiliki rahang kuat digunakan bagi menggigit, membunuh dan mencaricarikkan makanan.

Salah satu jenis ras anjing adalah Herder, anjing jenis ini merupakan salah satu jenis anjing tertua dan juga populer. Daya penglihatan dan pendengrannya tajam, kecepatannya dalam bergerak membuatnya cocok dijadikan anjing penjaga, anjing pekerja, anjing pelacak dan anjing penggembala ternak.

Selain kelebihan yang ada pada anjing hewan ini juga dapat menularkan penyakit ke manusia yaitu penyakit rabies (Tarigan, 2012). Rabies adalah penyakit zoonotik mematikan yang disebabkan oleh *Lyssavirus* dari familia *Rhabdoviridae*. Rabies menginfeksi hewan berdarah panas dan manusia yang terjangkit melalui gigitan hewan pembawa rabies (HPR) (Dodet *et al.*, 2008 dalam *Skripsi* Faizah 2012).

Anjing banyak mengeluarkan air liur karena anjing tidak mempunyai kelenjar keringat, sehingga untuk mengatur suhu tubuhnya anjing menurunkan panas tubuhnya dengan memproduksi air liur lebih banyak (Peter 1997).

Air liur anjing dalam agama Islam termasuk najis besar (*mughalladzah*) (Al-Mahfani, 2008 dalam *skripsi* Faiqoh, 2017). Oleh sebab itu masyarakat pada umumnya tidak mau mendekati anjing apalagi menyentuhnya dan apabila terkena tubuh ataupun bejana cara menyucikan najis ini yaitu dengan menggunakan air sebanyak tujuh kali yang salah satu dengan tanah (Suryani, 2013)

Dalam hadist dijelaskan bahwa untuk menghilangkan najis adalah dengan mencuci air atau dipanaskan di atas api. Menghilangkan najis berarti menghilangkan atau membersihkan dari bakteri hingga hilang warna, bau, dan rasanya. Hal demikian, islam merupakan perintis pertama yang memberikan suatu peringatan bahwa perubahan warna, bau, dan rasa menunjukkan adanya bakteri yang hidup dan aktif. Adapun benda-benda najis yang diisyaratkan oleh Al-qur'an dan hadist dan di dalamnya mengandung bakteri, antara lain: nanah, kotoran hajat, darah, tumpahan

(muntah), air liur anjing, babi, dan segala sesuatu yang membusuk seperti sisa-sisa hewan yang mati atau potongan hewan yang hidup (Erwan, 2008).

Pada air liur anjing dianggap sebagai najis besar dan kotor disebabkan adanya mikroorganisme patogen yang ada pada air liur tersebut dimana mikroorganisme yang dimaksud adalah bakteri dan virus yang sangat berbahaya bagi manusia (Al-Mahfani, 2008 dalam skripsi Faiqoh, 2017) beberapa penyakit yang biasanya menyerang anjing peliharaan, antara lain: rabies, leptospirosis, canine distemper, dan parvo virus. Penyakit tersebut dapat menularkan manusia (sunaryo, 2013).

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka peneliti ingin melakukan penelitian dengan judul “Identifikasi Molekuler Bakteri pada Saliva Anjing (*Canis lupus*) Ras Herder”, agar dapat mengetahui bakteri yang terdapat pada air liur anjing yang merupakan najis besar.

B. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah jenis bakteri apakah yang terdapat pada air liur anjing (*Canis lupus*) ras Herder Dewasa?

C. Ruang Lingkup Penelitian

Adapun ruang lingkup pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Herder adalah salah satu jenis ras anjing yang merupakan jenis anjing herding yang aktif diperoleh dari Jl. Vetran Bakung Samata Integrated Farming System SIFS.
2. Umur anjing (*Canis lupus*) ras Herder yaitu 2, 5 tahun jenis kelamin jantan dan umur 2,5 tahun jenis kelamin betina, sampel diambil dari 2 ekor anjing Herder.
3. Sampel air liur anjing (*Canis lupus familiaris*) Ras Herder Dewasa yang mengandung mikroorganisme patogen yang dapat membawa penyakit kepada manusia dan dapat menularkan penyakitnya pada manusia.
4. Identifikasi molekuler adalah metode yang dilakukan untuk mengetahui secara pasti spesies bakteri patogen yang ada pada air liur anjing (*Canis lupus*) ras herder. Berdasarkan hasil amplifikasi Gen 16S rRNA menggunakan PCR yang selanjutnya disekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida. Data nukleotida tersebut dimasukkan dalam program BLAST untuk dicocokkan dengan data spesies pada Gen Bank.
5. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.

D. Kajian Pustaka

Dalam kajian pustaka dibahas beberapa temuan hasil penelitian sebelumnya untuk melihat kejelasan arah, originalitas dan posisi dari penelitian ini, dibandingkan dengan beberapa temuan penelitian yang dilakukan sebelumnya yaitu sebagai berikut:

1. Hakim (2008), judul penelitian “Tanah dan sabun tanah sebagai bahan antimikroba terhadap air liur anjing” dengan metode identifikasi molekuler pada tanah dan mikroorganisme pada air liur anjing. Dari hasil penelitian terdapat bakteri yang teridentifikasi pada air liur anjing yaitu bakteri dari genus *Micrococcus* sp. Dengan struktur rata-rata soliter dan ada juga yang struktur bergerombol.
2. Pada penelitian sebelumnya bakteri pada saliva anjing telah diteliti oleh Kikuchi dkk (2004). Menggunakan metode uji molekuler dengan analisis elektroforesis untuk mengidentifikasi bakteri. Bakteri *Staphylococcus intermedius* yang menyebabkan infeksi pada rongga mastoid manusia setelah anjing menjilat telinga pasien.

E. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis bakteri yang terdapat pada air liur anjing (*Canis lupus familiaris*) Ras Herder Dewasa.

F. Kegunaan Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam bidang mikrobiologi mengenai spesies bakteri yang terdapat pada air liur anjing (*Canis lupus familiaris*) Ras Herder Dewasa.
2. Memberi sumbangan untuk pengetahuan terutama untuk dokter hewan, mahasiswa, dan orang yang sering berinteraksi dengan anjing khususnya non muslim bahwa pada air liur anjing terdapat bakteri yang hanya bisa di bersihkan dengan menggunakan tanah atau debu.

BAB II

TINJAUAN TEORITIS

A. Ayat yang Relevan

Anjing merupakan salah satu hewan yang disebut dalam al-Qur'anul Karim di antara banyaknya hewan di muka bumi ini. Sebenarnya banyak sekali hewan yang disebutkan Al-Quran, seperti katak, serigala, babi, unta, ikan, burung, lebah, lalat, semut, laba-laba, gajah, dan lain sebagainya. Sesuai dengan firman Allah swt. dalam QS, al-A'raaf/7: 176 yang berbunyi:

وَلَوْ شِئْنَا لَرَفَعْنَاهُ بِهَا وَلَكِنَّهُ أَخْلَدَ إِلَى الْأَرْضِ وَاتَّبَعَ هَوَاهُ فَمَثَلُهُ كَمَثَلِ الْكَلْبِ
إِنْ تَحْمِلَ عَلَيْهِ يَلْهَثُ أَوْ تَتْرُكُهُ يَلْهَثُ ذَلِكَ مَثَلُ الْقَوْمِ الَّذِينَ كَذَّبُوا بِآيَاتِنَا
فَاقْصُصِ الْقَصَصَ لَعَلَّهُمْ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١٧٦﴾

Terjemahnya:

Dan kalau Kami menghendaki, Sesungguhnya Kami tinggikan (derajat)nya dengan ayat-ayat itu, tetapi Dia cenderung kepada dunia dan menurutkan hawa nafsunya yang rendah, maka perumpamaannya seperti anjing jika kamu menghalaunya diulurkannya lidahnya dan jika kamu membiarkannya Dia mengulurkan lidahnya (juga). demikian Itulah perumpamaan orang-orang yang mendustakan ayat-ayat kami. Maka Ceritakanlah (kepada mereka) kisah-kisah itu agar mereka berfikir (Kementrian Agama RI, 2012).

Dari firman-Nya yang artinya “*Maka perumpamaannya seperti anjing jika kamu menghalaunya diulurkannya lidahnya dan jika kamu membiarkannya Dia mengulurkan lidahnya (juga)*” Para ahli tafsir telah berbeda pendapat mengenai maknanya. Menurut ungkapan Ibnu ishaq, dari Salim, dari Abu Nadhr, bahwa Bal'am

keluar lidahnya sampai dadanya . Maka *tasybih* (penyerupaan) dirinya dengan anjing yang menjulurkan lidahnya dalam kesetatannya dan menjadi terus-menerus, serta tidak mau mengambil mamfaat, baik diseru kepada yang beriman maupun tidak, sehingga menjadi seperti anjing yang menjulurkan lidahnya (Abdullah, 2003).

Pada ayat tersebut menjelaskan tentang perumpamaan orang yang sangat mencintai kehidupan dunia dan lebih menurutkan hawa nafsunya yang rendah. Sangat rendah sekali orang-orang yang mendustakan ayat-ayat Allah swt sampai Allah membuat perumpamaan seperti seekor anjing Maka dari itu manusia harus senantiasa mengingatkan saudara-saudara tentang ayat-ayat Allah yakni al-Qur'an.

Orang yang selalu mendustakan ayat-ayat Allah swt. seperti anjing yang mengulurkan lidahnya dan meneteskan air liurnya. lidah ini bisa digunakan untuk berdusta, jadi manusia yang selalu berdusta sama halnya dengan lidahnya anjing dan air liurnya.

B. Tinjauan Umum Anjing Herder (*Canis lupus familiaris*)

Anjing atau *Canis familiaris* merupakan salah satu hewan yang dapat hidup berdampingan dengan manusia dan merupakan mamalia karnivora yang telah mengalami domestikasi dari serigala abu-abu (*Canis lupus*) sejak 15.000 tahun yang lalu. Saat ini anjing telah berbeda dengan nenek moyangnya yang liar, menjadi sosok binatang dengan berbagai keistimewaan, terutama pada penglihatan, pendengaran, dan penciumannya (Budiana, 2006). Masyarakat umumnya memelihara anjing untuk menjaga ternak-ternak yang berada jauh dari tempat tinggal dalam hal ini anjing

memiliki kemampuan dapat berlari dengan cepat, memiliki sensitifitas yang tinggi serta daya penciuman yang tajam. Dalam perkembangan selanjutnya, hewan ini mulai dimanfaatkan untuk berbagai kepentingan hidup manusia (Sanu, 2015).

Hubungan anjing dan manusia sudah terjalin dengan sangat baik sejak zaman dahulu. Semula tugas anjing hanya menjaga, melindungi serta menyelamatkan harta benda tuannya, namun seiring berkembangnya waktu pelatihannya semakin maju, anjing sudah dimanfaatkan untuk menjaga pabrik, gudang, pertokoan dan peternakan, secara alami anjing sangat kuat untuk menjaga daerah tritorialnya. Tugas seperti ini biasanya dilakukan oleh anjing trah besar seperti Rottweiler, Doberman, pit bull, herder atau Belgian melanois (Hasromojo, 2008).

Neoteni anjing menurut American Kennel Club (1992) adalah:

1. Anjing gembala penjaga hewan ternak menunjukkan sifat-sifat anjing pemburu, namun secara terkendali. Anggota kelompok ini seperti Border collies, Belgian Malinois dan German shepherd sedangkan Welsh corgi, Canaan, dan Australian cattle bertindak lebih agresif sewaktu menggembalakan ternak.
2. Anjing pemburu (gun dog atau bird dog) merupakan teman manusia sewaktu berburu. Anjing pointing breed (penunjuk lokasi buruan), setter (pencari hewan buruan), spaniel dan retriever (pemungut buruan)
3. Anjing pelacak (*Scenthound*) tetap mempunyai ukuran tubuh sedang dan pola tingkah laku membuntuti mangsa dengan cara mengikuti jejak baunya. Anjing

yang termasuk kedalam kelompok ini adalah Beagle, Bloodhound, Basset Hound, Coonhound, Dachshund, Fox Hound, Otter Hound, dan Harrier.

4. Sighthound merupakan anjing yang mengejar dan menyerang segala mangsa yang terlihat. Anjing yang termasuk ke dalam kelompok ini tetap mempertahankan bentuk fisik anjing dewasa, dengan ciri fisik khas seperti dada sempit dan tubuh yang langsing. Tapi anjing jenis ini sudah tidak lagi memiliki daun telinga tegak dan bulu dua lapis mirip mantel seperti yang dimiliki serigala. Afghan, Borzoi, Saluki, Sloughi, Pharaoh Hound, Azawakh, Whippet, dan Greyhound termasuk ke dalam kelompok ini.
5. Jenis Mastiff yang bertubuh besar dan tinggi, memiliki bagian dada yang besar seperti dada manusia, telinga yang besar dan tengkorak yang tebal. Kelompok anjing ini secara tradisional dibiakkan untuk perang dan anjing penjaga.
6. Jenis Bulldog yang berukuran tubuh sedang, dibiakkan untuk berkelahi melawan hewan peliharaan lain atau binatang liar. Anjing jenis ini memiliki tengkorak persegi, tulang yang besar, bahu yang lebar, dan berotot kuat.
7. Jenis Terrier memiliki sifat agresif dan kurang tunduk pada anggota kawanan yang lebih senior. Kelompok ini memiliki ciri fisik anjing dewasa seperti telinga tegak, walaupun jenis yang disenangi kebanyakan berukuran tubuh kecil dan memiliki kaki yang pendek, sehingga anjing jenis ini bisa mengejar mangsa yang berada di dalam liang.

German shepherd atau lebih dikenal dengan anjing herder merupakan jenis anjing herding. Anjing jenis ini aktif dan pekerja keras. Postur tubuhnya bagus,

kemampuan berpikirnya juga sangat baik. Herder merupakan salah satu jenis anjing tertua dan juga populer. Daya penglihatan dan pendengarannya tajam, kecepatannya dalam bergerak membuatnya cocok dijadikan anjing penjaga, anjing pekerja, anjing pelacak dan anjing penggembala ternak. Ciri fisik dan karakternya cukup khas, Bulu herder lazimnya berwarna atau coklat dan kombinasi warna coklat dan hitam atau coklat, hitam, dan putih, herder dewasa beratnya 34-40 kg dengan tinggi 55-65 cm (Redaksi, 2008).



Gambar 3.1. Herder (*Canis lupus*)

Adapun klasifikasi dari anjing (*Canis lupus*) yaitu:

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Classis : Mamalia

Ordo : Canidia

Genus : Canis

Species : *Canis lupus* (Rosadi, 2014).

C. Tinjauan Umum Air Liur Anjing

Saliva merupakan salah satu dari cairan dalam rongga mulut yang diproduksi dan disekresikan oleh kelenjar saliva serta dialirkan kedalam rongga mulut melalui saluran. Saliva terdiri dari 98% kandungan air dan sisanya adalah elektrolit, mukus, dan enzim-enzim. Air liur anjing berbahaya bagi manusia. Persatuan Dokter Kesehatan Anak (PDKA) di Munich-Jerman, mengungkapkan bahwa air liur anjing mengandung berbagai kuman penyebab penyakit salah satunya adalah virus rabies. Virus / bakteri yang terdapat dalam air liur anjing dapat masuk ke organ dalam manusia melalui sistem terbuka (Suryani, 2013).

Anjing banyak mengeluarkan air liur karena anjing tidak mempunyai kelenjar keringat, sehingga untuk mengatur suhu tubuhnya anjing menurunkan panas tubuhnya dengan memproduksi air liur lebih banyak. Kelenjar saliva terbagi menjadi 2 bagian yaitu kelenjar saliva mayor (*parotid, mandibularis, sublingual, dan zygomaticus*), dan kelenjar saliva minor yang terdapat di daerah *ventral buccalis* (Peter 1997).

Sekresi saliva distimulasi oleh *N. Facialis* (superior) dan *N. Glossopharyngeus* (inferior), keduanya dipengaruhi oleh sistem saraf simpatis (komposisi air liur) dan parasimpatis (volume air liur). Sedangkan rangsangan terhadap sekresi saliva dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain: panca indera (perasa, penciuman dan penglihatan), mekanik (mastikasi), iritasi atau infeksi, hormonal (bradikinin), dan obat (atropin) (Sjuhada 2007)

D. Tinjauan Umum Bakteri

Bakteri merupakan golongan prokariot dan berukuran sangat kecil (mikroskopik), serta memiliki peran besar dalam kehidupan di bumi. Beberapa kelompok bakteri dikenal sebagai agen penyebab infeksi dan penyakit, sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat dibidang pangan, pengobatan, dan industry (Colome, 2001). Spesies bakteri dapat dibedakan berdasarkan morfologi (bentuk), komposisi kimia (umumnya dideteksi dengan reaksi biokimia), kebutuhan nutrisi, aktivitas biokimia dan sumber energy (sinar matahari dan bahan kimia) (Pratiwi, 2008).

Bakteri tersusun atas dinding sel dan isi sel. Di sebelah luar dinding sel terdapat selubung atau kapsul. Di dalam sel bakteri tidak terdapat *membran* dalam (*endomembran*) dan organel bermembran seperti *kloroplas* dan *mitokondria*. Berikut akan disajikan susunan sel bakteri, berturut-turut dari dinding sel, *membrane sitoplasma*, dan *sitoplasma* (Irianto, 2006).

Bakteri dapat digolongkan menjadi dua kelompok yaitu gram positif dan gram negatif didasarkan pada perbedaan struktur dinding selnya. Pada umumnya bakteri gram negatif lebih tahan terhadap aktivitas antimikroba dibandingkan dengan bakteri gram positif (Hafsan, 2009).

Bentuk bakteri bermacam-macam, yaitu sebagai berikut:

1. Bakteri Berbentuk Bulat (Bola)

Bakteri berbentuk bulat atau bola dinamakan *Kokus (coccus)*; dapat dibedakan atas:

- a. *Monokokus*, yaitu bakteri berbentuk bola tunggal, misalnya *Neisseria gonorrhoeae*, penyebab penyakit kencing nanah.
- b. *Diplokokus*, yaitu bakteri berbentuk bola yang bergandengan dua-dua, misalnya. *Diplococcus pneumonia*, penyebab penyakit pneumonia atau radang paru-paru.
- c. *Sarkina*, yaitu bakteri berbentuk bola yang berkelompok empat-empat, sehingga bentuknya mirip kubus.
- d. *Streptokokus*, yaitu bakteri bentuk bola yang berkelompok memanjang membentuk rantai.
- e. *Stafilokokus*, yaitu bakteri berbentuk bola yang berkoloni membentuk sekelompok sel tidak teratur, sehingga bentuknya mirip dompolan buah anggur.

2. Bakteri Berbentuk Batang

Bakteri berbentuk batang dinamakan *basilus* (*bacillus* yang berarti batang).

Bentuk basilus dapat pula dibedakan atas:

- a. *Basil tunggal*, yaitu bakteri yang hanya berbentuksatu batang tunggal misalnya *Salmonella typhi*, penyebab penyakit tifus.
- b. *Diplobasil*, yaitu bakteri berbentuk batang yang bergandengan dua-dua.
- c. *Streptobasil*, yaitu bakteri berbentuk batang yang bergandengan memanjang membentuk rantai misalnya *Bacillus anthracis* penyebab penyakit antraks.

3. Bakteri Berbentuk Melilit

Bakteri berbentuk melilit, yang dinamakan *spirillum* atau spiral. Ada tiga macam bentuk spiral, yaitu sebagai berikut.

- a. Spiral, yaitu golongan bakteri yang bentuknya seperti spiral, misalnya Spirillum. Sel tubuhnya umumnya kaku.
- b. Vibrio atau bentuk koma yang dianggap sebagai bentuk spiral tak sempurna, misalnya Vibrio cholera penyebab penyakit kolera.
- c. Spirochaeta (baca: spiroseta), yaitu golongan bakteri berbentuk spiral yang bersifat lentur. Pada saat bergerak, tubuhnya dapat memanjang dan mengerut (Irianto, 2006).

Menurut (Irianto, 2006) faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah sebagai berikut:

- a. Sumber energi, yang diperlukan untuk reaksi – reaksi sintesis yang membutuhkan energi dalam pertumbuhan dan restorasi, pemeliharaan keseimbangan cairan, gerak dan sebagainya.
- b. Sumber karbon.
- c. Sumber nitrogen, sebagian besar untuk sintesis protein dan asam-asam nukleat.
- d. Sumber garam-garam anorganik, khususnya folat dan sulfat sebagai anion; dan potasium, sodium magnesium, kalsium, besi, mangan sebagai kation.
- e. Bakteri-bakteri tertentu membutuhkan faktor-faktor tumbuh tambahan, disebut juga vitamin bakteri, dalam jumlah sedikit untuk sintesis metabolik esensial

Terdapat beberapa cara untuk identifikasi bakteri antara lain :

- a. Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan langsung digunakan untuk mengamati pergerakan, dan pembelahan secara biner, mengamati bentuk dan ukuran sel yang alami, yang pada

saat mengalami fiksasi panas serta selama proses pewarnaan mengakibatkan beberapa perubahan (Irianto, 2006).

b. Pembiakan Bakteri

Pembenihan atau media yaitu campuran bahan-bahan tertentu yang dapat menumbuhkan bakteri, jamur ataupun parasit, pada derajat keasaman dan inkubasi tertentu. Pembiakan diperlukan untuk mempelajari sifat bakteri untuk dapat mengadakan identifikasi, determinasi, atau differensiasi jenis-jenis yang ditemukan.

Medium pembiakan terdiri dari :

1. Medium pembiakan dasar

Pembiakan dasar adalah medium pembiakan sederhana yang mengandung bahan yang umum diperlukan oleh sebagian besar mikroorganisme dan dipakai juga sebagai komponen dasar untuk membuat medium pembiakan lain. Medium ini dibuat dari 3 g ekstrak daging, 5 g pepton dan 1000 ml air. Dinamakan juga bulyon nutrisi. Dengan penambahan 15 agar-agar diperoleh apa yang dinamakan agarnutrisi atau bulyon agar (Irianto, 2006).

2. Medium pembiakan penyubur (*Euriched Medium*)

Medium pembiakan penyubur dibuat dari medium pembiakan dasar dengan penambahan bahan lain untuk mempersubur pertumbuhan bakteri tertentu yang pada medium pembiakan dasar tidak dapat tumbuh dengan baik. Untuk keperluan ini ke dalam medium pembiakan dasar sering ditambahkan darah, serum, cairan tubuh, ekstrak hati dan otak (Irianto, 2006).

3. Medium pembiakan selektif

Medium pembiakan selektif digunakan untuk menyeleksi bakteri yang diperlukan dari campuran dengan bakteri-bakteri lain yang terdapat dalam bahan pemeriksaan. Dengan penambahan bahan tertentu bakteriyang dicari dapat dipisahkan dengan mudah (Irianto, 2006).

E. Tinjauan Umum Biologi Molekuler

Teknik analisis biologi molekuler adalah salah satu kunci dalam memahami dogma sentral dalam biologi. Keberadaan teknik ini akan membantu kita memahami proses replikasi, transkripsi, tanslasi, dan lain-lain. Dengan teknik ini dimungkinkan kita akan dapat mengenal organisme sampai pada tingkatan molekuler yaitu sampai pada tingkatan DNA, RNA, asam amino, dan protein. Pengetahuan awal mengenai alat-alat yang dipakai dalam teknik analisis biologi molekuler menjadi sangat penting untuk dipahami. Alat-alat tersebut bisa dikelompokkan berdasarkan alat utama dan alat pendukung. Alat utama dapat berupa thermocycler, elektroforesis, Geldoc transiluminator, sequencer, dan lain-lain. Sedangkan alat-alat pendukung lainnya diantaranya adalah oven, spektrofotometer, vortex, mikropipet, dan lain-lain (Holil, 2014).

1. *Deoxyribonucleic Acid (DNA)*

DNA merupakan material genetik yang diturunkan dari generasi ke generasi berikutnya. Gen disusun oleh suatu substansi yang disebut dengan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). DNA bersama protein dan molekul RNA (*Ribonucleic*

Acid) terdapat dalam inti sel. Ketiganya saling terkait membentuk kromosom yang adalah komponen penting semua makhluk hidup (Muladno, 2002).

DNA merupakan bahan penyusun gen dan makromolekul beruntai ganda berbentuk heliks yang berfungsi sebagai pewarisan sifat yang menyimpan beragam materi genetik. Tiap molekul DNA terdiri atas dua rantai panjang yang masing masing tersusun dari empat jenis penyusun kimiawi yang disebut nukleotida. Masingmasing nukleotida itu sendiri terdiri atas tiga bagian, yaitu suatu molekul organik yang disebut basa nitrogen, suatu molekul gula pentosa/*deoxyribose* (gula berkarbon lima), dan gugus fosfat (Campbell *et al.*, 2002).

Gula pentosa dan gugus fosfat bersifat identik sedangkan basa nitrogen mempunyai susunan dan bentuk yang berbeda dalam satu nukleotida dengan nukleotida lain. Terdapat empat macam basa nitrogen yaitu Adenin, Guanin, Timin dan Sitosin. Basa adenin dan guanin digolongkan sebagai basa purin, sedangkan basa timin dan sitosin sebagai basa pirimidin (Manz *et al.*, 2004). Struktur molekul DNA terdiri atas dua rangkaian nukleotida yang tersusun secara linier. Kedua rangkaian yang saling berikatan terbentuk seperti tali berpilin (*double helix*) (Muladno, 2002).

DNA berfungsi untuk menyimpan informasi genetik secara lengkap yang diperlukan untuk mencirikan struktur semua protein dan RNA tiap-tiap spesies organisme, untuk membuat program pada saat yang tepat dan menempatkan biosintesis sel dan komponen jaringan secara teratur, dan untuk menentukan kekhususan organisme tertentu (Campbell *et al.*, 2002).

2. Identifikasi Molekuler melalui Amplifikasi Gen 16S-rRNA

Kunci untuk mengerti keragaman mikroba adalah sistem klasifikasi yang dapat diandalkan. Secara tradisional, bakteri diklasifikasikan terutama berdasarkan sifat-sifat fenotipik. Akan tetapi hasilnya tidak selalu dapat diandalkan secara filogeni. Metode molekuler terutama klasifikasi dan identifikasi berbasis filogenetik, menggunakan parameter yang tidak bergantung pada kondisi pertumbuhan dan media yang digunakan. Pendekatan yang umum dipakai saat ini adalah analisis sekuen gen 16S-rRNA (Case *et al.*, 2007). Ribosomal RNA (r-RNA) merupakan salah satu makromolekul paling menarik karena molekul ini merupakan kerangka dari ribosom yang sangat berperan dalam mekanisme translasi. Semua rRNA identik secara fungsional yakni terlibat dalam produksi protein. Meski demikian, sekuen di bagianbagian tertentu terus berevolusi dan mengalami perubahan pada level struktur primer sambil tetap mempertahankan struktur sekunder dan tersier yang homologus (Schluenzen *et al.*, 2000).

Pendekatan analisis pada tingkat molekuler (genomik) dapat diaplikasikan pada spesies yang belum dapat dikulturkan di laboratorium. Berbagai metode dapat dilakukan untuk menganalisis DNA, diantaranya AFLP, ARDRA, PFGE, dan lain-lain. Namun dari berbagai metode yang digunakan, rRNA paling banyak digunakan sebagai marka molekuler. Pada prokariot terdapat tiga macam ribosomal RNA (rRNA), yaitu 5S-rRNA, 16S-rRNA, dan 23S-rRNA. Molekul 5S-rRNA tersusun dari 120 basa. Urutan basa molekul tersebut sangat pendek, sehingga molekul 5S-rRNA tidak ideal dari segi analisis statistika. Molekul 23S-rRNA tersusun dari 2900 basa.

Molekul ini menyulitkan analisis karena memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang. Prosedur baku digunakan untuk menentukan hubungan filogenetik dan mendefinisikan spesies adalah melalui amplifikasi gen 16S-rRNA (Jusuf, 2001).

3. Teori Umum PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara invitro. Teknik ini ditemukan oleh Kary B. Mullis dan F. Faloona pada tahun 1985. PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatis fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5' dari kedua untai target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (primer PCR) untuk memungkinkan DNA template disalin oleh DNA polimerase (Nasir, 2002).

Tujuan dari PCR adalah untuk membuat sejumlah besar duplikasi suatu gen. Hal ini diperlukan agar diperoleh jumlah DNA cetakan awal yang cukup untuk sekuensing DNA ataupun untuk memperoleh material genetik yang diperlukan dalam proses rekayasa genetik. Tahapan pengerjaan PCR secara umum terdiri dari isolasi DNA/RNA, pengecekan integritas isolat DNA/RNA secara spektrofotometri atau elektroforesis, pencampuran komponen reaksi PCR, pemrograman mesin PCR pada kondisi optimum, amplifikasi reaksi dan deteksi/evaluasi hasil reaksi (Sari, 2006).

Siklus PCR dibagi menjadi 3 tahap yaitu pemisahan utas DNA pada suhu tinggi (denaturasi), penempelan primer, dan pemanjangan primer menjadi utas baru DNA oleh enzim DNA polimerase. Tiap-tiap tahapan memerlukan suhu yang berbeda. Tahap denaturasi merupakan tahap awal reaksi yang berlangsung pada suhu

tinggi, yaitu 94⁰C hingga 96⁰C, dilakukan sampai 5 menit untuk memastikan semua utas DNA terpisah. Tahap denaturasi bertujuan untuk memisahkan utas ganda DNA menjadi utas tunggal sebagai DNA cetakan dengan memutuskan ikatan hidrogen antar pasangan basa. Semakin panjang untaian rantai DNA, semakin lama waktu yang diperlukan untuk tahap denaturasi (Berg *et al.* 2007).

Tahap kedua adalah penempelan primer atau annealing pada suhu sekitar 42⁰C hingga 65⁰C. Suhu penempelan ini bersifat spesifik yang merupakan rata-rata dari nilai T_m yang dimiliki masing-masing primer, yaitu forward (5'-end) dan reverse (3'-end). Perbanyakan fragmen DNA dilakukan secara selektif dan spesifik oleh sepasang oligonukleotida yang disebut primer. Primer merupakan sekuen DNA pendek dengan frekuensi 15 hingga 25 panjang basa dan berutas tunggal. Primer menempel pada bagian DNA cetakan yang memiliki urutan basa komplementer dengan urutan basa primer. Tahap ini di dalam replikasi sel berfungsi sebagai inisiasi sintesis DNA oleh primase untuk membentuk RNA primer pada situs ori (Handoyo, 2001).

Tahap ketiga adalah perpanjangna primer. Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72oC diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini 30 diperpanjang sampai 5

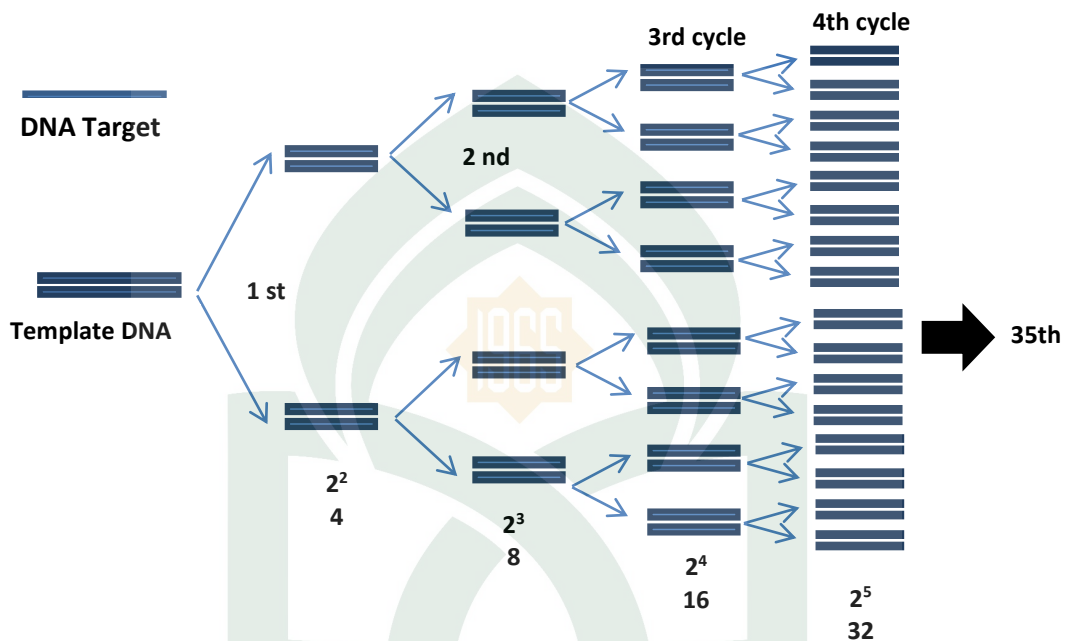
menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Muladno, 2002).

Di dalam proses PCR, terjadi siklus yang berulang. 1 copy DNA setelah satu siklus akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4 copy, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 copy dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial (Gaffar, 2007).

Menurut Yuwono (2006), pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama adalah :

- a. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10^5 – 10^6 molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
- b. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18 – 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Dan mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60%.
- c. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg^{2+} sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.
- d. Enzim DNA Polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh dari Eubacterium yang disebut *Thermusaquaticus*, spesies ini diisolasi dari taman Yellowstone pada tahun 1969. Enzim polimerase taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan

membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.



Gambar 2.3 Ilustrasi amplifikasi PCR (Sumber: Vierstraete, 1999 dalam Arham, 2015)

Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20 o C); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%; disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM $MgCl_2$. Pada proses PCR menggunakan menggunakan alat termosiklus. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi.

Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi. Selain itu kelebihan lain metode PCR dapat diperoleh pelipat gandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-9} mol) sebesar 200.00 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Reaksi ini dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 ug oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dari reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50-100 ul. DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipat gandakan suatu sekuens DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri dalam tabung PCR (Mahardika, 2005).

4. *Elektroforesis Gel Agarosa*

Elektroforesis adalah sebuah metode untuk separasi atau pemisahan sebuah molekul besar (seperti protein, fragmen DNA, RNA dll) dari campuran molekul yang serupa. Elektroforesis digunakan untuk memisahkan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Sebuah arus listrik dilewatkan melalui medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan (Yuwono, 2006).

Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk mengetahui keberadaan dan membedakan jenis asam nukleat yang didapat dari hasil ekstraksi serta digunakan untuk menganalisis produk hasil pemotongan dengan enzim restriksi. Prinsip dasar elektroforesis adalah berdasarkan laju perpindahan suatu molekul oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekulnya, semakin kecil ukurannya maka molekul akan semakin cepat lajunya, begitu pula sebaliknya. Sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur pada gel yang berada di dalam larutan penyangga dan dialirkan listrik pada tegangan tertentu. Molekul-molekul sampel akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai muatannya. Arah pergerakan untuk RNA dan DNA adalah menuju elektroda positif karena adanya muatan negatif pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya (Berg *et al.* 2007).

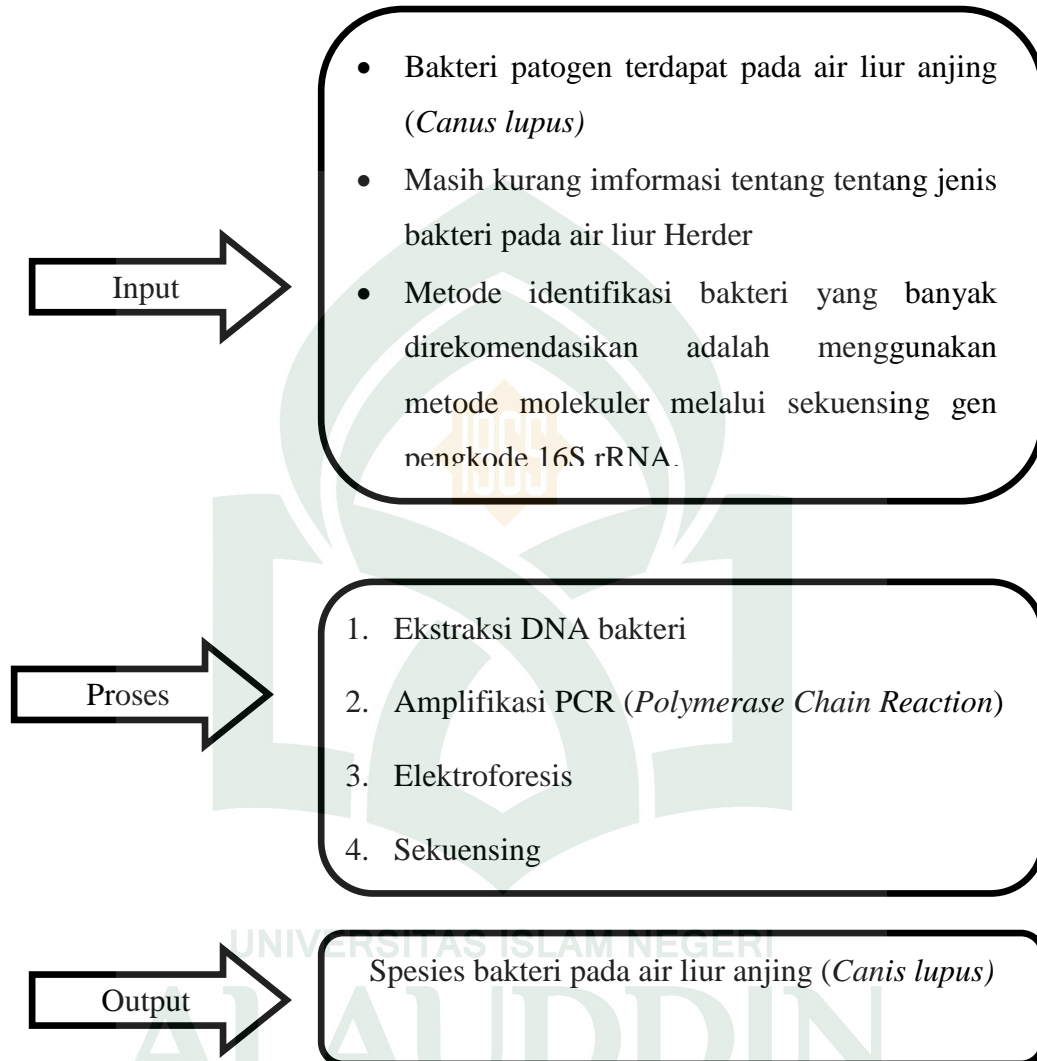
Manfaat elektroforesis gel antara lain untuk mengetahui ukuran fragmen DNA dari produk PCR, memisahkan produk DNA dari hasil digesti yang berbeda ukuran, lalu dapat disequencing, dan juga untuk pemurnian atau purifikasi DNA. Elektroforesis dapat di aplikasikan untuk berbagai macam kegiatan, antara lain membandingkan gen homolog dari spesies yang berbeda, mengetahui susunan sekuens berbagai genom, DNA finger printing, mengetahui ada atau tidaknya gen-gen penyebab kelainan genetic atau penyakit tertentu, mendeteksi lokasi dan jumlah mRNA dalam sel atau jaringan tertentu, mengetahui aktivitas gen selama perkembangan berbagai tipe sel organisme atau aktivitas gen sebelum dan sesudah diberi perlakuan tertentu, mempelajari evolusi di tingkat molekular, mengetahui

variasi genetic dalam populasi natural di alam, menentukan atau mengidentifikasi berat molekul fragmen DNA, RNA, protein dan aktivitas enzimatik (Muladno, 2002).

Didalam proses elektroforesis komponen bahan kimia terpenting yang digunakan dalam proses tersebut adalah gel (Sambrook, 2001). Elektroporesis DNA akan lebih baik menggunakan medium penyangga berupa gel buatan seperti agarosa. Agarosa bersifat tidak toksik, kompleks berupa bubuk yang terdiri atas campuran dua unit dasar alaktosa, agarosa dan agaropketin. Biasanya konsentrasi agarosa yang digunakan bervariasi antara 0,5-2% (Sari, 2006).



F. Kerangka Pikir



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Pendekatan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif dengan pendekatan eksploratif untuk menentukan bakteri pada air liur anjing dewasa (*Canis lupus*) ras Herder Dewasa.

B. Variabel Penelitian

Penelitian ini memiliki variabel tunggal yaitu jenis bakteri yang terdapat pada air liur anjing dewasa (*Canis lupus*) ras Herder.

C. Defenisi Operasional Variabel

1. Bakteri pada saliva anjing dewasa (*Canis lupus*) ras Herder adalah bakteri yang menjadi biang penyakit pada makhluk hidup. Bakteri patogen ini bekerja dengan cara menginfeksi organisme dan sebagai akibatnya, muncul gejala-gejala abnormal yang kita kenali sebagai tanda-tanda penyakit.

2. Bakteri saliva anjing (*Canis lupus*) ras Herder teridentifikasi melalui metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, incubator, jarum ose, oven, Laminar Air Flow (LAF), sarung tangan, masker, Bunsen, mikropipet, mikroskop, sentrifuge, water bath, hot plate dan stirrer, mesin thermalyler/ PCR (*Polymerase Chain Reaction*), satu set alat elektroforesis, UV transulaminator, computer, freezer-20 °C, Sub Cell GT Electrofofesis System, Profuge Gk-Centrifuge, ice maker, Gel Doc XR Model 785, Tabung PCR, Parafilm, Erlenmeyer, Filter tips 0.5-10 µl, Filter tips 10-200 µl, Filter tips 100-1000 µl, Disposable gloves, VipPlus PCR Chiller, Tabung eppendorf, dan Kit ekstraksi DNA.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain air liur anjing (*C. lupus*), medium M9, media BA (Bord Agar), gen 16S-rRNA, DNA kit, 200 µl PBS (*Phosphate Buffer Seline*), 20 µl Protease K, 200 µl Buffer GSB (*Gel Sulubilization Buffer*), alkohol 5%, GD Columb 2 µl *collection tube*, 400 µl *Buffer W1*, 600 µl *Wash Buffer* (Geneid), 100 µl *Elution Buffer*, Primer Forward, Primer Reserve, MgCl₂, H₂O, Dntp MIX, GEL RED, Loading dye, Agarose, Marker 100bp, dan TBE Buffer 10x.

E. Prosedur Kerja

1. Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan adalah saliva anjing yang diambil dari mulut anjing liar (*Canis lupus*) dengan metode Swab dan pot sampel (air murni).

2. Identifikasi Isolat Bakteri pada Saliva Anjing

Identifikasi bakteri pada saliva anjing (*Canis lupus familiaris*) ras Herder dideterminasi dengan menggunakan sekuen 16S-rRNA Analisis Cluster pada sekuen tersebut dilakukan dengan program *BLAST* (*Basic Local Alignment Tool*) dari *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*). Gen 16S-rRNA dianalisis secara lengkap di 1st Base Malaysia. Adapun langkah-langkah analisis gen 16S-rRNA dilakukan sebagai berikut:

a. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA pada dasarnya merupakan serangkaian proses pemisahan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Pada ekstraksi DNA ini metode yang digunakan adalah metode ekstraksi DNA Kit (GenJET DNA Purification Kit). Langkah-langkah ekstraksi DNA adalah sebagai berikut:

1. Pot Sampel (A)

a. Preparasi Sampel (*sample preparation*)

Sampel saliva anjing dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge (semua) kemudian tambahkan 600µl (*Phospat Buffer Saline*), centrifuge sampel mengambil pelet.

b. *Cell lysis* (Melisiskan sel)

Masukkan Carrier RNA ke tabung mikrocentrifuge sebanyak 1,8 μ l. Tambahkan 600 μ l Buffer S₂ ke dalam tabung mikrocentrifuge sebanyak 1.500 μ l, lalu vortex. Tambahkan proteinase K sebanyak 600 μ l lalu vortex. Inkubasi selama 10 menit. Tambahkan 600 μ l GSB buffer lalu vortex, inkubasi selama 10 menit.

c. DNA Building

Tambahkan ethanol 600 μ l lalu vortex selama 10 detik. Memindahkan semua campuran tersebut ke dalam GD Column (Spin column), sentrifugasi pada 13.000 Rpm selama 1 menit. Buang collection tube yang berada di bawah spin column dan mengganti dengan collection tube yang baru.

d. Wash (Pencucian)

Tambahkan 1.200 μ l buffer W1 lalu sentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan yang sama kemudian buang cairan yang ada pada collection tube. Tambahkan 1.800 μ l wash buffer (Geneid) sentifuge selama 1 menit, lalu buang cairan pada collection tube dan sentrifuge kembali selama 3 menit. Buang collection tube dan letakkan mikrocentrifuge steril pada bagian bawah spin column.

e. Elution

Selanjutnya tambahkan 300 μ l Elution buffer kemudian sentrifuge dengan kecepatan yang sama selama 1 menit. Cairan yang mengandung DNA yang tertampung pada tabung mikrocentrifuge disimpan pada -4°C untuk digunakan sebagai template PCR.

2. Swab Steril (B)

a. *Preparasi Sampel (sample preparation)*

Swab dimasukkan ke dalam tabung mikrocentrifuge kemudian tambahkan 1.500 µl S1 Buffer, proteinase K 60 µl lalu vortex, inkubasi selama 10 menit.

b. *Cell lysis (Melisiskan sel)*

Memasukkan swab ke dalam collection tube dan sisa cairan sampel (volume tidak ditentukan). Centrifuge pada 13.000 Rpm selama 2 menit. Mengambil hasil saringan dan memindahkan ke collection tube baru dan buang swab. Tambahkan 1.500 µl S2 Buffer ke dalam tabung mikrocentrifuge sebanyak lalu vortex. Inkubasi selama 10 menit.

c. *DNA Binding*

Tambahkan ethanol 1.500 µl lalu vortex selama 10 detik. Memindahkan semua campuran tersebut ke dalam GD Column (Spin column) sebanyak 2.250 µl, sentrifugasi pada 13.000 Rpm selama 1 menit. Buang collection tube yang berada di bawah spin column dan mengganti dengan collection tube yang baru.

d. *Wash (Pencucian)*

Tambahkan 1.800 µl wash buffer lalu sentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan yang sama kemudian buang cairan yang ada pada collection tube, pindahkan ke collection tube baru.

e. *Elution*

Selanjutnya tambahkan 300 µl Elution buffer kemudian sentrifuge dengan kecepatan yang sama selama 1 menit. Cairan yang mengandung DNA yang

tertampung pada tabung mikrocentrifuge disimpan pada -4°C untuk digunakan sebagai template PCR.

b. Amplifikasi PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

PCR (*Polimerase Chain Reaction*) merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro* (di dalam tabung). PCR juga dikatakan teknik perbanyakan DNA secara *in vitro*. Prosesnya meliputi 3 tahap, yaitu denaturasi dengan suhu 95°C selama 30 detik, annealing dengan suhu 55°C selama 30 detik dan ekstention dengan suhu 72°C selama 1 menit. 46 Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diisolasi, ekstrak DNA dari sampel dan aquadest sebagai kontrol negatif. "PCR mix" dimasukkan ke dalam tabung PCR:

Tabel 3.1 Komposisi PCR mix

Reaksi	(μL)
Enzym KAPA ready mix	25 μl
MgCl	2 μl
Primer forward	1 μl
Primer riferse	1 μl
DNA template	5 μl
Nucleus free wather	16 μl
Total PCR mix	50 μl

(Sumber: Sari *et al.*, 2013 dengan sumber primer oleh (Marchesiet *al.*, 1997))

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (DNA thermal Cycler). Untuk amplifikasi PCR, tahap awal denaturasi pada suhu 95°C selama 15 menit, selanjutnya 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 55°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 1 menit sebanyak 40 siklus dilanjutkan dengan ekstensi akhir suhu 72°C selama 5 menit dan 12°C \pm 30 menit untuk penyimpanan.

c. Elektroforesis Gel Agarose

Agarosa dibuat dengan melarutkan 2 g agarose (BioRad) dalam 100 ml 10 Tris borate EDTA (100 g Tris base, 27.5 g asam borat, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.047 dalam 1 liter air). Kemudian dipanaskan sampai mendidih dan larut. Selanjutnya ditambahkan 1 μ l ethidium bromida (0.2 μ g/ml) dan dimasukkan dalam pencetak gel yang telah dipasang sisir. Setelah agarosa memadat (sekitar 30 menit) selanjutnya dimasukkan ke dalam tank elektroforesis yang berisi larutan TBE 0.5%. Masukkan DNA sampel yang telah dicampur dengan cairan "loading dye" ke dalam sumur dengan perbandingan 2:1, kemudian dimasukkan Marker 100 bp setelah keseluruhan sampel dimasukkan. Elektroda dihubungkan dengan power supply kemudian dinyalakan selama 1 jam + voltase 100 volt, 400 Ampere. Setelah itu, alat elektroforesis dimatikan kemudian gel dari alat tersebut diambil. Gel dipindahkan kedalam UV transiluminator kemudian diamati hasilnya pada komputer. Ukuran fragmen hasil amplifikasi PCR ditentukan dengan cara dibandingkan antara posisi ukuran penanda DNA (Marker) dengan ukuran fragmen sampel.

d. Analisis Data Sekuensing

Analisis data sekuensing dilakukan dengan menggunakan program software DNA star. Untuk analisa sequence alignment, dilakukan dengan membandingkan sekuens yang diperoleh (query) dengan yang telah ada pada Gene Bank dengan database searches NCBI internet site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan BLAST (Basic Local AlignmentSearch Tool). Ukuran fragmen hasil amplifikasi PCR ditentukan dengan cara dibandingkan antara posisi ukuran penanda DNA (Marker) dengan ukuran fragmen sampel. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya band pada ukuran 996 bp.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

F. Hasil Penelitian

Identifikasi molekuler dilakukan pada 4 sampel air liur anjing (*Canis lupus*) dari 2 ekor anjing dewasa Ras Herder. Pot sampel atau air liur murni diberi kode sampel (A) dan untuk sampel swab (B). Anjing pertama dengan kode NCA dan NCB sedangkan anjing kedua dengan kode NBA dan NBB.

Adapun hasil elektroforesis dari produk amplifikasi gen 16S-rRNA yang dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (*DNA Thermal Cycler*) keempat sampel air liur anjing (*Canis lupus*) Ras Herder seperti pada gambar berikut



Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis dari Produk Amplifikasi gen 16S-rRNA, NBA, NBB, NCA dan NCB 996 bp.

1. Hasil squensing urutan basa nitrogen sampel (Air liur murni (NCA dan NBA)

CTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGTCTTAGCTG
ACTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT
GGATGATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTT
GACATGGCAGGAACCTTACCAGAGATGGTTTGGTGCTCGAAAGAGAACC
TGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCTACGAAAG
GGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTC

CTGGGCGTAAGGGCGCGCACGCGGTTTGTAGTCAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAAGTGCCTTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTA
GAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGAATAATACTGACGCTCA
TGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTCTGATTTGGAGTTTGGGGCTCTTGAGGCCTTGCTTC
CGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGGTGGGGAGTACGGCCGCCAGGT
TAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCCCACAAGCGGTGGATCATGT
GGTTTA

Gambar 4.2 Urutan basa nukleotida sampel NCA dan NBA

2. Hasil squensing urutan basa nukleotida sampel (swab (NCB dan NBB))

GGGGCGATATCGATTACTGGGTAAAGGTGCGTAGGCGGGTCGTAAAGT
CAGAGGTGAAAGCCTGCGGCTTAAGTGGGGAACTGCCTTTGATACTGG
CGATCTTGAGTGTATTTGAGGTAGGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATGAGTAGGAATACCGATTGCGAAGGCAGGCTACTGGG
TTACTACTGACGCTCATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGGTA
TTATACTTCATAGACCAAGCGAAAGTGATAAATTAGCCCCCTGGGGAGT

```

TAAGTCAGCGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCTTACATTTGCGTTTAAAA
CGGGAGTCCTGGATGGACTCAGGGATGCTGGAAATTCCGGTGGAACGG
TGAAATGGTTAAAAAATGCGAAGAAATCCCAACGGCAAAGGCGGTGTC
CGGGGTGCTACTGGACCTGANGCTCGAAAGTGTGGGTATCCAAACAGG
ATTAAATCCCCGGGTATCCCCCCCCGTAAAACAAGGATACTCGGAGTTTG
GGATATACTGTAAGCTACCAAGCGAAAGCATTAAGTATAACCACTGGG
GAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGGCCGCC
CAAACGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACCCGAGGAACCTTA
CCCGGGCTTGAACTAGACAGGACAGACCAAGAAATTGGTTTTTCTTCCG
ACCTGTTTACAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTG
TCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTCTCCTCGGTTGCCATCA
GGTGATGCTGGGCACTCCGTGGACACTGCCATCGTAAGAT

```

Gambar 4.5 Urutan basa nukleotida sampel NCB dan NBB

Hasil sekuensing yang diperoleh dari malaysia selanjutnya dianalisis pada Gen Bank menggunakan analisis BLAST. Hasil analisis BLAST dari keempat sampel seperti pada table di bawah ini:

Kode Sampel	Spesies	Strain	Max Score	Total Score	Query cover	Ident
NCA	Hydrogenophaga sp.	WLSH 50	852	852	100 %	99%
NCB	Prevotella sp.	ZY032	734	734	100%	90%
NBA	Serratia Marcescens	RTB37	601	601	100%	92%
NBB	Bergeyella Zoohelcom	OH357	496	496	100%	92%

Tabel 4.1. Bakteri Hasil Blast sampel NCA, NCB, NBA dan NBB

G. Pembahasan

Dalam proses identifikasi molekuler mikroorganisme terdapat 4 proses utama yang paling dasar yaitu ekstraksi DNA, PCR, dan elektroforesis serta tahap paling penting yaitu sekuensing. Tahap ekstraksi DNA merupakan serangkaian proses yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya, sehingga diperoleh DNA murni. Isolasi/ekstraksi DNA diperoleh dengan cara merusak atau memecahkan dinding sel sehingga DNA akan keluar dari dalam sel.

Pada tahap ekstraksi terjadi pemisahan benang-benang DNA dengan komponen sel yang lain. Proses ekstraksi DNA yang dilakukan memacu pada pedoman instruksi manual oleh geneaid dengan menggunakan Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit. Didalam prosedur manual ini ada beberapa proses penting dalam ekstraksi yaitu preparasi sampel (*sample preparation*), lisis sel (*cell lysis*), pengikatan DNA (*DNA binding*), pencucian (*wash*) dan elusi (*elution*).

Kit komersial Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit menggunakan prinsip mini column atau filtrasi DNA. Pertama dinding sel dihancurkan, untuk bakteri gram positif menggunakan *gram (+) buffer* yang telah ditambahkan lysozyme sedangkan untuk bakteri gram negatif menggunakan *gram (-) buffer* dan proteinase K. Sel dilisis menggunakan *lysisbuffer* (buffer GB). DNA diendapkan dengan ethanol absolut, difilter, dan dicuci dengan *washing buffer* (buffer W1 dan buffer wash). Terakhir, DNA dilarutkan dalam *elution buffer*. Ekstraksi DNA dengan mini column

merupakan metode ekstraksi yang paling umum dilakukan karena hasil yang didapatkan sangat baik dalam waktu yang tidak lama dan biaya yang lebih murah.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini memiliki fungsi yang berbeda-beda. *Gram (+) buffer* (Geneaid) yang telah ditambahkan lysozyme berfungsi khusus untuk menghancurkan dinding sel bakteri gram positif, penambahan *buffer* bertujuan untuk menjaga keadaan pH tetap stabil sehingga DNA tidak rusak selama pengerjaan. Proteinase K yang berfungsi menghancurkan komponen sel (terutama protein) dan *Gram (-) buffer* (Geneaid) fungsinya khusus untuk menghancurkan dinding sel bakteri gram negatif. *GB Buffer* (Geneaid) berfungsi untuk melisiskan sel bakteri. Etanol absolut digunakan untuk mengendapkan atau pemekatan DNA. *Washbuffer* digunakan untuk membersihkan DNA dari pengotor lain.

Tahap selanjutnya adalah proses PCR yang bertujuan untuk melipatgandakan suatu pita DNA secara *in-vitro*. Dalam pengerjaannya terdapat reaksi berantai yaitu denaturasi, annealing dan pemanjangan lagi (Irawan, 2008). Proses PCR ini dilakukan sebanyak 35 siklus selama ± 2 jam. Adapun bahan-bahan yang digunakan yaitu ddH₂O, *KAPA Master Mix*, primer forward (63F), primer reverse (1387R), MgCl₂ serta DNA sampel yang telah dieskstraksi. *KAPA Master mix* PCR komersial ini berfungsi sebagai komponen atau campuran DNA template yang akan diamplifikasi menggunakan mesin PCR. Primer Forward berfungsi untuk menginisiasi sintesis untai DNA dari ujung 5' ----- 3' sedangkan Primer Reverse berfungsi untuk menginisiasi sintesis untai DNA dari ujung 3' ----- 5'. Fungsi *DNA template* di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul

DNA baru yang sama. $MgCl_2$ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polymerase sedangkan ddH₂O berfungsi sebagai pelarut DNA.

Tahap selanjutnya yaitu elektroforesis DNA yang merupakan suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan (Yuwono, 2005). Hasil dari proses ekstraksi dan PCR dapat dilihat dengan cara elektroforesis yaitu dengan melihat ketebalan pita DNA sampel tersebut. Dari elektroforesis tersebut dapat dilihat panjang base pair (bp) setiap sampel dengan menggunakan bantuan marker (penanda). Tahap elektroforesis dilakukan selama 40 menit 100 volt pada gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Adapun bahan yang digunakan dalam proses elektroforesis yaitu agarose, *buffer*, marker 100bp, *loading dye* dan *Ethidium bromide*. Agarose sebagai reseptor titik dari senyawa-senyawa yang akan dipisahkan dan menyediakan jalur bagi migrasi komponen. *Buffer* berfungsi sebagai konduktor arus yaitu jembatan konduksi di antara dua elektroda, sehingga memungkinkan terjadinya aliran medan listrik dan menstabilkan pH. Marker DNA yang terdapat dalam gel elektroforesis berfungsi untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi dan sebagai penanda posisi molekul DNA yang bermigrasi untuk menentukan perkiraan ukuran basa-basanya. *Loading dye* berfungsi sebagai pemberat agar tidak keluar dari sumuran. *Ethidium bromide* sebagai pewarna DNA.

Dari hasil elektroforesis kedua sampel diketahui terdapat pita yang terseparasi dan sejajar dengan marker sekitar 996 bp. Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen

gen yang teramplifikasi dengan ukuran ± 996 bp, sehingga dapat disimpulkan bahwa proses amplifikasi kedua isolat bakteri kitinolitik berhasil dilakukan. Target yang telah dicapai ini cukup untuk melakukan identifikasi spesies bakteri tersebut.

Dari hasil elektroforesis sampel Selanjutnya hasil dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia yang kemudian akan dikirim ke 1stBASE sequencing INT di Malaysia untuk pemetaan pasang basa yang berhasil diamplifikasi. Hasil yang diperoleh dari malaysia selanjutnya dianalisis pada Gen Bank menggunakan analisis BLAST. Identifikasi gen 16s rRNA diawali dengan tahap sekuensing. Amplikon gen 16s rDNA disekuensing untuk memperlihatkan urutan basa nukleotidanya, basa A,T,G,C yang menyusun urutan basa gen sesuai dengan primer yang digunakan. Setelah urutan basa nukleotida dari gen 16s rRNA terlihat, maka dilakukan analisis dengan menggunakan program Bioedit (Novita, 2011).

Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil analisis urutan basa adalah berupa elektroferogram yang berupa urutan sekuen DNA dari seluruh dunia yang didepositkan pada database Gen Bank. Analisis hasil BLAST tersebut memberikan informasi mengenai bakteri apa yang mempunyai kesamaan dengan urutan DNA sampel sehingga dapat digunakan untuk identifikasi bakteri. Informasi dari hasil BLAST tersebut berupa *Max Score* dan *Total Score*, *Query Coverage*, *E-value* dan *Identities*. ciri-ciri sekuen dari gene bank yang paling mirip dengan sekuen DNA yang diperoleh yaitu, nilai *Max Score* dan *Total Score* sama, *Query coverage* mendekati 100%, *E-Value* mendekati 0, dan *Identities* mendekati 100%. Dari keempat parameter tersebut, nilai *Query Coverage*

yang paling penting karena menunjukkan persentase Database yang tertutupi oleh *Query*. Apabila nilai *E-Value* semakin mendekati nol, hasilnya akan lebih terpercaya dan bila nilainya 1, maka tidak boleh digunakan.(Narita, 2012).

Berdasarkan Table 4.1 menunjukkan bahwa hasil analisis BLAST sampel air liur murni (NCA) terdapat bakteri *Hydrogenophaga* sp strain nilai *Query cover* dari setiap bakteri yang teridentifikasi yaitu 99%, dengan demikian persentase tersebut menunjukkan keselarasan panjang sekuens sampel dengan *database* spesies yang terdapat pada *gene bank*. Semakin tinggi nilai persentase dari *Query cover* maka semakin tinggi pula tingkat homologinya (Nugraha, 2014). Nilai *identity* dari masing-masing spesies yaitu 98%, jika nilai semakin tinggi dan mendekati 100% maka tingkat homologinya juga semakin tinggi. Tingginya nilai persentase ini akan mengindikasikan persamaan sekuen sampel dengan sekuen *database* (Claverie dan Notredama, 2003).Sedangkan untuk sampel swab (NCB) terdapat bakteri *Prevotella* sp. dengan nilai nilai *Query cover* dari setiap bakteri yang teridentifikasi yaitu 98%, dan nilai *identity* 87% dan 83%.

Menurut wulandari, 2011. Jika urutan basa memiliki persamaan yang tinggi maka strain dapat dimasukkan dalam satu spesies yang sama. Hasil analisis BLASTn terhadap gen 16S rRNA yang mempunyai homologi urutan kurang dari 98% menunjukkan bahwa spesies yang dibandingkan merupakan spesies berbeda, homologi antara 93-95% menunjukkan bahwa spesies yang dibandingkan berada pada genus yang berbeda dan homologi antara 89-93% menunjukkan spesies yang dibandingkan berada pada famili yang berbeda.

1. *Hydrogenophaga* sp.

Berdasarkan hasil analisis BLAST Genus *Hydrogenophaga* saat ini terdiri dari lima spesies yaitu *Hydrogenophaga flava*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Hydrogenophaga palleronii*, *Hydrogenophaga taeniospiralis* dan *Hydrogenophaga intermedia*.

Adapun klasifikasi dari *Hydrogenophaga* sp. yaitu:

Kingdom : Bakteri
Filum : Proteobacteri
Kelas : Betaprobacteria
Ordo : Burkholderiales
Famili : Comamonadaceae
Genus : *Hydrogenophaga*
Spesies : *Hydrogenophaga* sp. (Willems dkk. 1989).

Pada penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa *Hydrogenophaga* sp. dapat diisolasi dari tanah, lumpur, dan air dengan pengayaan untuk bakteri hidrogen (Tanamol *et al.* 2011).

2. *Prevotella* sp.

Prevotella adalah genus bakteri Gram-negatif anggota flora oral dan vagina, dan pulih dari infeksi anaerobik pada saluran pernapasan. Telah diisolasi dari abses dan luka bakar di sekitar mulut, gigitan (Tanaka *et al.*, 2008). Dalam sebuah penelitian

bakteri usus anak-anak di Burkina Faso (di Afrika), bakteri *Prevotella* mendominasi terdiri dari 53% bakteri usus (*De Filippo* 2011).

Adapun klasifikasi dari *Prevotella* sp. yaitu:

Kingdom : Bakteri
Filum : Bacteroidetes
Kelas : Bacteroidetes
Ordo : Bacteroidales
Famili : Prevotellaceae
Genus : *Prevotella* (Tanaka *et al*, 2008).

3. *Serratia marcescens*

Serratia marcescens merupakan spesies bakteri gram negatif berbentuk batang dari keluarga Enterobacteriaceae. Besifat Patogen pada manusia, *Serratia marcescens* terlibat dalam infeksi saluran kemih, infeksi luka (Hejasi, 1997).

Adapun klasifikasi dari *Serratia mescenscens* yaitu:

Kingdom : Bakteri
Filum : Proteobactera
Kelas : Gammaproteobacterium
Ordo : Enterobacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Serratia*
Spesies : *Serratia mescenscens* (Hejasi, 1997).

4. *Bergeyella zoohelcum*

Bergeyella adalah genus berbentuk batang, Gram negatif, aerobik, non spora dan non motil (Shen *et al*, 2007). *Bergeyella zoohelcum* adalah patogen zoonosis yang tidak dilaporkan yang menyerang manusia setelah digigit binatang, dapat ditemukan pada cairan hidung dan mulut anjing (Shukla dkk, 2004)

Bergeyella. zoohelcum sebelumnya telah dilaporkan dari seorang pria 35 tahun yang terluka setelah gigitan dari harimau Siberia (Isotalo, 2000).

Adapun klasifikasi dari *Bergeyella zoohelcum* yaitu:

Kingdom	: Bakteri
Filum	: Bacteriodetes
Kelas	: Flavobakteria
Ordo	: Flavobakteriales
Famili	: Flavobacteriaceae
Genus	: <i>Bergeyella</i>
Spesies	: <i>Bergeyella zoohelcum</i> (Shen <i>et al</i> , 2007).

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Adapun hasil identifikasi molekuler saliva anjing (*Canis lupus*) ras Herder dewasa yaitu pada sampel NCA terdapat bakteri *Hydrogenophage* sp. Sedangkan pada sampel NCB terdapat bakteri *Prevotella* sp. Kemudian pada sampel NBA terdapat bakteri *Serratia marseculensis*, sedangkan pada sampel NBB terdapat bakteri *Bergeyella zoohelcum*,

B. Saran

Adapun saran pada penelitian selanjutnya yaitu:

1. Perlunya pengembangan penelitian lebih mendalam tentang identifikasi bakteri pada saliva anjing (*Canis lupus*) dan diharapkan sampai ketahap haram yang diujikan dengan tanah.
2. Sebaiknya peneliti membandingkan mengidentifikasi bakteri pada saliva anjing yang berada pada suhu lingkungan yang dingin seperti malino dengan lingkungan yang panas.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott, S.L., Connor, O.J., Robin, T., Zimmer, B.L. *Biochemical Properties of a Newly Described Escherichia Species, Escherichia albertii* .*Journal of Clinincal Microbiology* 41no. 10 (2003): 4852–4854.
- Alfousan, W., Dhar, R., Hashemi, H.A., Sweih, N.A. “Clinical and microbiological characteristics of Chryseobacterium spp.isolated from neonates kuwait”. *Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kuwait University, Kuwait*37 (2014):762-764.
- Al-Mahfani, M.K. *Buku pintar shalat*. Jakarta: Wahyu media, 2008.
- American Kennel Club. *The Complete Dog Book: The Photogaph, History and Official Standard of Every Breed Admitted to AKC Registration, and the selection, Training, Breeding, Care and Feeding of Pure-Bred Dogs. 18th Edition*, 1992. Hal 724.
- Arham,Washilul. Identifikasi Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal Asal Bromo Jawa Timur Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA. *Skripsi*. Jember: Jurusan Biologi Fakultal MIPA Universitas Jember, 2015.
- Berg MJ, Tymoczko JL, and Stryer L. *Biochemistry*.Six Edition. San Fransisco: WH Freeman, 2007.
- Budiana,N.S. *Anjing*. Jakarta: Penebar Swadaya, 2006.
- Campbell NA, Reece JB, and Mitchell LG. *Biologi*.Edisi ke-5.Penerjemah; Lestari R. Editor; Safitri. Jakarta: Erlangga, 2002. Terjemahan dari *Biology 6th Edition*.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, and Kjelleberg S. "Use of16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies".*Applied and Environmental Microbiology* 73 no.1 (Januari 2007): 278–288.
- Caubilla, B.J, and Forsythe, S. “Dry Strees and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated infant formula”.*Journal Food Protection* 12 (2007):467-472.

- Chan, T.F., Loo, J.F., Kong, S.K. "Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore based technique". *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 no. 2 (2014): 855-862.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. "Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa". *Proceedings of the National Academy of Science* 107 no. 33 (2010): 14691–14698.
- Kementrian Agama RI, *Al-Quran dan Terjemahnya*. Bogor: Syamil Quran, 2012.
- Dodet, B., Goswami, A., Gunasekera, A., Guzman, F., Jamali, S., Montalban, C., Purba, W., Quiambao, B., Salahuddin, N., Sampath, G., Tang, Q., Tantawichien, T., Wimalaratne, O., Ziauddin, A. " Rabies awareness in eight Asian countries". *Vaccine* 26 no. 50 (2008).
- Downes, J., Floyd, E., Anne, C.R., William, G.W. "Deskripsi *Alloprevotella rava* gen Nov., Sp. November., diisolasi dari rongga mulut manusia, dan reklasifikasi *Prevotella tanneri* Moore et al. 1994 sebagai *Alloprevotella tanneri* gen". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* .63, No. 4 (2012), 1214-1218.
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, "The Prokariota-Proteobacteria: Alpha dan Beta Subclasses (edisi ke-3), 2006).
- Faiqoh, E. Formulasi sabun cair tanah sebagai penyuci najis mughalladzah dengan variasi tanah kaolin dan bentoit. *Skripsi*. Jakarta : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, 2017
- Faizah, N., Batan, I.W., Suatha, I.K. "Gambaran Klinik Sapi Bali Tertular Rabies di Ungasan, Kutuh dan Peminge". *Indonesia Medicus Veterinus* 1 no. 3 (2012) : 370 – 384.
- Farmer, JJ III, Asbury, M.A., Hickman, FW. and Brenner, D.J. "The Enterobacteriaceae Study Group (USA). 'Enterobacter sakazaki': a new species of 'Enterobacteriaceae' Isolated from clinical specimen". *International Jurnal System Bacteriol* 30 no. 3 (1980): 569–84.
- Gaffar, Sharbani. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Jurusan Kimia FMIPA: Universitas Padjajaran, 2007.
- Hakim Jeffry. "Tanah Dan Sabun Tanah Sebagai Bahan Antimikroba Terhadap Air Liur Anjing". *Skripsi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor, 2008.

- Hatmosrojo, R., Budiana, NS. "Melatih anjing penjaga," Jakarta, penebar swadaya, 2008.
- Hejasi, A. and Falkiner, F. "*Serratia marcescens*". *Journal Medical*
- Holil, M.Si., Kholifah. 2014. *Teknik Analisis Biologi Molekuler (TABM)*. Universitas Islam Negeri (Uin) Maulana Malik Ibrahim Malang: Malang.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T. " *Bergeyella manual of determinative bacteriology 9th ed* " 1994.
- Hong, H.O., Khaneja, R., Tam, N.M., Cazzato, A., Urdaci, M., Brisson, A., Gasbarinni, A., and Cutting S.M. "*Bacillus subtilis isolated from the human gastrointestinal tract*". *Research in Microbiology* 160 no. 2 (2009): 134-143.
- Hunter, Catherine, J., Mikael, P., Ford, H.R., Prasadarao, N.V. "Enterobacter sakazaki: An Emerging Pathogen in Infants and Neonates". *Surgical Infections* 9 no.5 (April 2017): 533-539.
- Irawan, Bambang. *Genetika Molekuler*. Surabaya: Airlangga University Press, 2008.
- Isotalo, P.A., Edgar, D., Toye, B. " Polimicrobial tenosynovitis with pasteurella multocida and other Gram-negative Bacilli after a siberian tiger bite ". *Journal Clin Phatol* 53 (2000): 871-872.
- Jawetz, Melnick. "*Medicial Microbiologi* 24th edition. USA: Mc-Graw Hill companies 2007
- Jusuf M. *Genetika I : Struktur dan Ekspresi Gen*. Jakarta: Infomedika, 2001.
- Manz A, Nicole P, and Dimitri I. *Bioanalytical Chemistry*. London: Imperial College Press, 2004.
- Muladno. *Seputar Teknologi rekayasa Genetika*. Bogor: PustakaWirausahaMuda, 2002.
- Narita V, Arum AL, Siti IM, dan Fawzya NY. "Analisis Bioinformatika Berbasis WEB untuk Eksplorasi Enzim Kitosanase Berdasarkan Kemiripan Sekuens". *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains Dan Teknologi*. 1 no. 4 (September 2012): 197-203.
- Natsir, D & Sartini. "*Dasar-Dasar Mikrobiologi*" .Makassar: Laboratorium Mikrobiologi Farmasi. Universitas Hasanuddin, 2006.

- Novita, S., Priyo, P., RizkyA.R. “*Isolasi, karakterisasi, dan identifikasi molekuler bakteri amilolitik Umbi singkong (manihot esculentacrantz.*”Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka, 2011.
- Ochman, H. *Genomes on the Shrink*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). 102 no. 34 (2005): 11959-11960.
- Peter C Goody. *Dog Anatomy*. London: J.A Allen, 1997.
- Pratiwi, S.T. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Erlangga, 2008.
- Reina, J., and Borrel, N. “ Leg abscess caused by weeksella zoohelcum following a dog bite ”.Clin. Menulari. Dis 14 (1992): 1162-1163.
- Rosadi, B. “Taksonomi vertebrata”. Tangerang Selatan: Penerbit Universitas Terbuka, 2014.
- Rubbenstroth, D. “ Description of Riemerella columbipharyngis sp. nov., isolated from the pharynx of healthy domestic pigeons (Columbia livia f. domestica, and emended descriptions of the genus riemerella, Riemerella anatipestifer and Riemerella columbina)”. *International Journal System Evol Microbiologi*, (2013).
- Sambrook, J., E.F. Fritsch 7 T. Maniatis. *Molecular Cloning ALaboratori Manual, Ed ke-2*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Sanu, E.M., Sanam, M.U.E., Tangkonda, E. “Uji Sensitivitas Antibiotika Terhadap *Staphylococcus aureus* Yang Diisolasi Dari Luka KulitAnjing Di Desa Merbaun, Kecamatan Amarasi Barat Kabupaten Kupang .*Jurnal Kajian Veteriner* 3 no. 2 (2015): 175-179.
- Sari IP. “Analisis keragaman Genetik Bakteri Endofitik dan Filosfer padi dengan Teknik ARDRA (Amplited Ribosomal DNA Restriction Analysis)” *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB, 2006.
- Schlutzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, and Yonath A. “Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 A Resolution”. *Cell* 102 no.5 (2000): 615–623.
- Shen, F.T., Kamper, P., Young, C.C., Lay W.A and Arun A.B. “*Chryseobacterium thaichungense* sp. nov. isolated from contaminated soil”. *Internatonal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (May 2005): 1301- 1304.

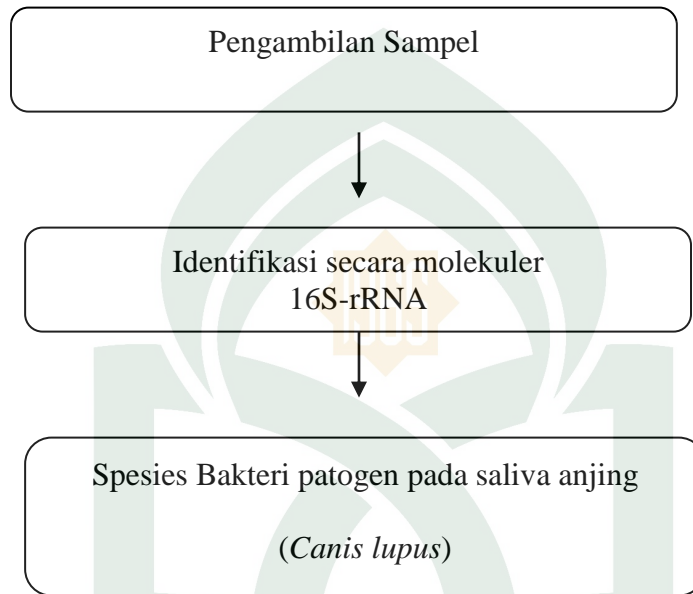
- Shen, Y.C., Lin, W.R., Penghao, G., Zhongwen, W. "Cellulitis and bacteremia Caused by *Bergeyella zoohelcum*". *Journal of the Formosan Medical Association* 106 no.7 (2007): 573-576.
- Shukla, S.K., Paustian, D.L., Paul, N.L. "Isolation a Fastidious *Bergeyella* Spesies Associated with Cellulitis after a cat bite and a Phylogenetic Comparison with *Bergeyella zoohelcom*" *Journal Clinical Microbiology* 42 n0. 1 (2004): 290-293.
- Slonczewski, J.L. and Foster, J.W. "Microbiology. An Evolving Science (3rd ed.)". WW Norton & Company, 2014.
- Sudoyo, dan Aru, W. "Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam". Jakarta: Internal Publishing, 2007.
- Sukiya. *Biologi Vertebrata*. Malang: UM Press, 2005.
- Sunaryo Eunike Y. Pusat Pemeliharaan, perawawatan, dan pelatihan anjing peliharaan. Depok: universitas Atmajaya Yogyakarta, 2013.
- Suryani, P.S., Puspitasari, P., Rangkuti, S.H., Wijaya, V.P., Windradini, R. *Sabun Tanah Berbentuk Kertas Ramah Lingkungan Sebagai Alternatif Praktis Penghilang Najis Air Lir Anjing*. Laporan Akhir PKM-P. Institut Pertanian Bogor, 2013.
- Talan, D.A., Citron, D.M., Abrahamian, F.M., Moran, G.J. " Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites " *Journal Medical* 340 (1999): 85-92
- Tan, J.S. " Bacteriologic analysis of Human Zoonotic infections transmitted by dogs and cats ". *Journal Medical* 157 (1997): 1933-1943.
- Tanaka, S., Yoshida, M., Murakami, Y. "The relationship of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella melaninogenica* in the supragingival plaque of children, caries and oral malodor". *Journal Clinic Pediatr Dent* 32 no.3 (2008): 195-200.
- Tanamol, V., Imai, T., Virutai, P., and Kaekandnetra, P. "Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp. Isolated from Soil Environment during Batch Fermentation" *Journal of Life Sciences* 5 (2011): 1003-1012.

- Vancannet, M., Vandamme, P., Segers, P., Torck, U., Coopman, R., Kersters, K. and Hins, K.H. " *Riemerella columbina* sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons " *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49 (1999): 289-295.
- Vandamme, P., Bernardet, J.F., Segers, K. and Holmes, B. "New perspectives in the classifications of the flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom". *International Journal System Bacteriology* 44 (1994): 827-831.
- Wahbah az-Zuhaily. *Fiqih Islam*. Jakarta: Gema Insani Darul Fikir, 2010.
- Willems, A., Busse, J., Goor, M., Falsen, E., and Auling, G. "Hydrogenophaga, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing Bacteria That Includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (Formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (Formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (Formerly *Pseudomonas pseudoflava* and "*Pseudomonas carboxydoflava*"), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (Formerly *Pseudomonas taeniospiralis*)". *International Journal of Systematic Bacteriology* 39 no. 3 (1989): 319–333.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K. and Chen, Y.Y. "Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes" *.Science*. 334(2011).
- Ryan, K.J., and Ray, C.G. eds. 4. "Sherris Medical Microbiology" *McGraw-Hill Professional Med*, 2004.
- Yuwono, T. *Teori dan aplikasi: PCR*. Yogyakarta: Penerbit Andi, 2006.
- Zamora, L., Fernández, G JF., Vela, A.I. "*Bergeyella porcorum* sp. nov., isolated from pigs". *Systematic and Applied Microbiology* 39 no. 3 (May 2016): 160-163.

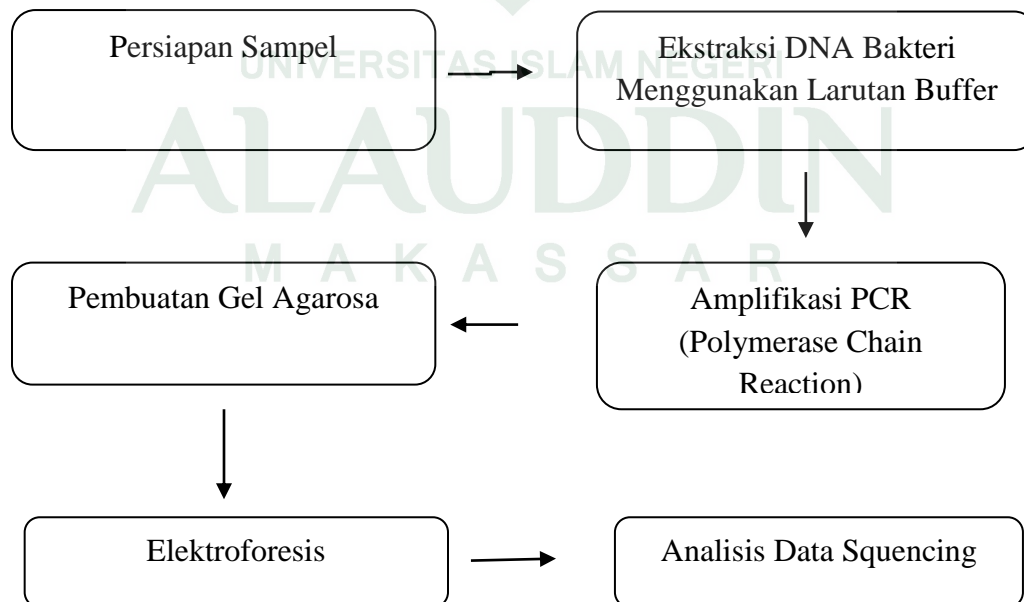
LAMPIRAN - LAMPIRAN

Lampiran 1:

Skema Kerja



Alur Kerja Identifikasi Molekuler

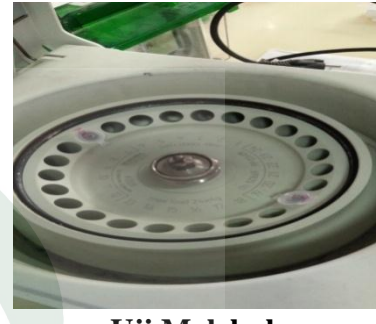
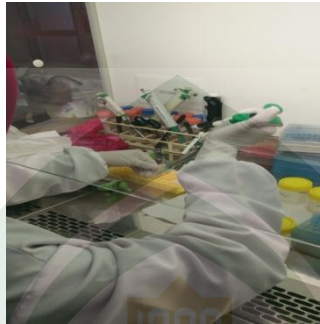


Lampiran 2:

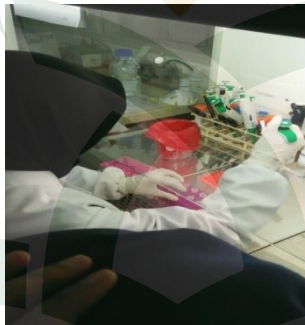
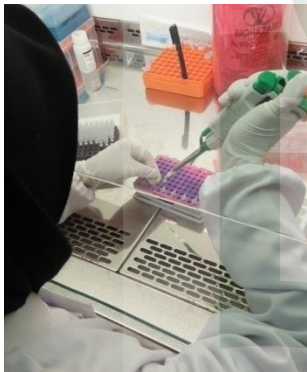
- **Proses Pengambilan Sampel**



Lampiran 4

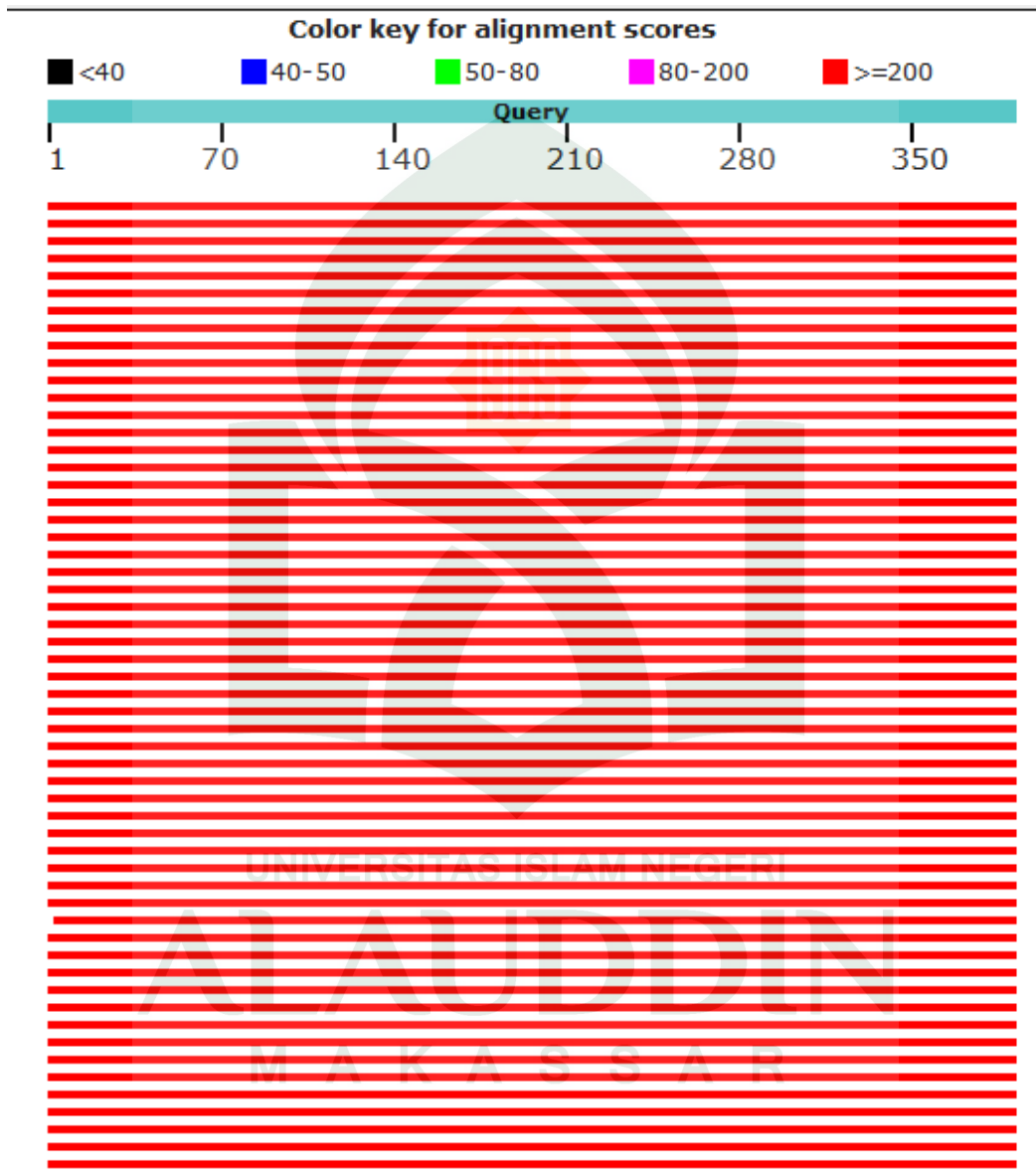


• Uji Molekuler



Lampiran 5

- Hasil Sekuensing Sampel Air Liur Murni (NBA



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Escherichia sp. mixed culture J1-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	601	601	100%	7e-168	94%	KR029171.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain RTB37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	601	601	100%	7e-168	94%	JN800446.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone ncd1470h09c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	599	599	100%	2e-167	94%	KF098278.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone nck191b06c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	599	599	100%	2e-167	94%	KF094376.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone nck34a12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	599	599	100%	2e-167	94%	KF076769.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone ncd1617f06c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	599	599	100%	2e-167	94%	JF144148.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone ncd1600f01c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	599	599	100%	2e-167	94%	JF138126.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone ncd1599h02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	599	599	100%	2e-167	94%	JF138111.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone ncd1469b11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	599	599	100%	2e-167	94%	JF126462.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain RBT37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	595	595	100%	3e-166	94%	MG231231.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	595	595	100%	3e-166	94%	MF399283.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain 35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	595	595	100%	3e-166	94%	MF399282.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	595	595	100%	3e-166	94%	MF399280.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	595	595	100%	3e-166	94%	MF399278.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured Serratia sp. partial 16S rRNA gene, clone 2sv2-24L	595	595	100%	3e-166	94%	LT854843.1
<input type="checkbox"/>	Serratia sp. UIWRF0166 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	595	595	100%	3e-166	94%	KR190315.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain G35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	595	595	100%	3e-166	94%	KM019734.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone nck232a04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	595	595	100%	3e-166	94%	KF097039.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Serratia marcescens strain RTB37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

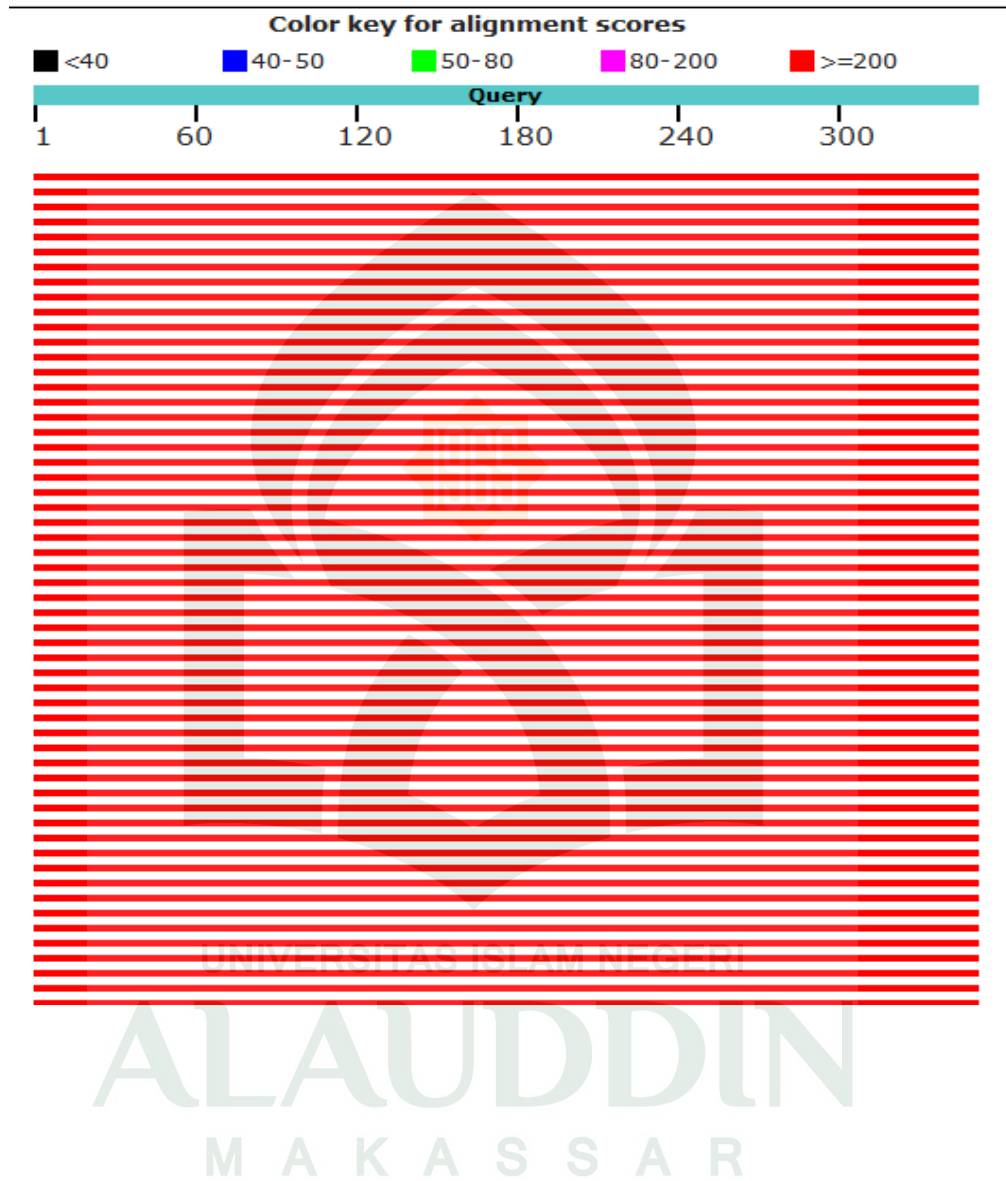
Sequence ID: [JN800446.1](#) Length: 1453 Number of Matches: 1

Range 1: 544 to 938 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
601 bits(325)	7e-168	372/395(94%)	2/395(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGGGCGTAA-GGGCGCGCACGCGGTTTGT-AGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC	58		
Sbjct 544	CTGGGCGTAATGGGCGCACGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC	603		
Query 59	CTGGGAACTGCCTTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGG	118		
Sbjct 604	CTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTATAGGGGGGTAGAATCCAGG	663		
Query 119	TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGA	178		
Sbjct 664	TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGA	723		
Query 179	ATAATACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG	238		
Sbjct 724	CTAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG	783		
Query 239	TCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGTTTGGGCTCTTGAGGCCTTGCTTCCGGAGCT	298		
Sbjct 784	TCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGTTTGTGCCCTTGAGGCCTTGCTTCCGGAGCT	843		
Query 299	AACGCGTTAAATCGACCGGCTGGGGAGTACGGCCGCCAGGTTAAAACTCAAATGAATTGA	358		
Sbjct 844	AACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGA	903		
Query 359	CGGGGCCCCCACAAGCGGTGGATCATGTGGTTTA	393		
Sbjct 904	CGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA	938		

- Hasil Sekuensing Sampel Swab (NBB)



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bergeyella zoohelcum strain OH357 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	KM461977.1
Uncultured Bacteroidetes bacterium clone SSN10G07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	JN568080.1
Uncultured Bacteroidetes bacterium clone SSG10C05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	JN567849.1
Bergeyella zoohelcum strain D658 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	NR_104718.1
Uncultured bacterium clone ncd2496q03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	JF215404.1
Uncultured bacterium clone ncd550b10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	HM278095.1
Uncultured bacterium clone ncd1648a10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	JF145988.1
Uncultured bacterium clone ncd1770q03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	JF142464.1
Uncultured bacterium clone ncd1526f12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	JF128225.1
Bergeyella zoohelcum gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 19-462-2	496	496	100%	3e-136	92%	AB591064.1
Uncultured bacterium clone ncd948c11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	HM329084.1
Uncultured bacterium clone ncd480b09c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	HM327683.1
Uncultured bacterium clone ncd473e03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	HM327298.1
Uncultured bacterium clone ncd495d05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	HM316125.1
Uncultured bacterium clone ncd556q06c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	496	496	100%	3e-136	92%	HM278549.1

Bergeyella zoohelcum strain OH357 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

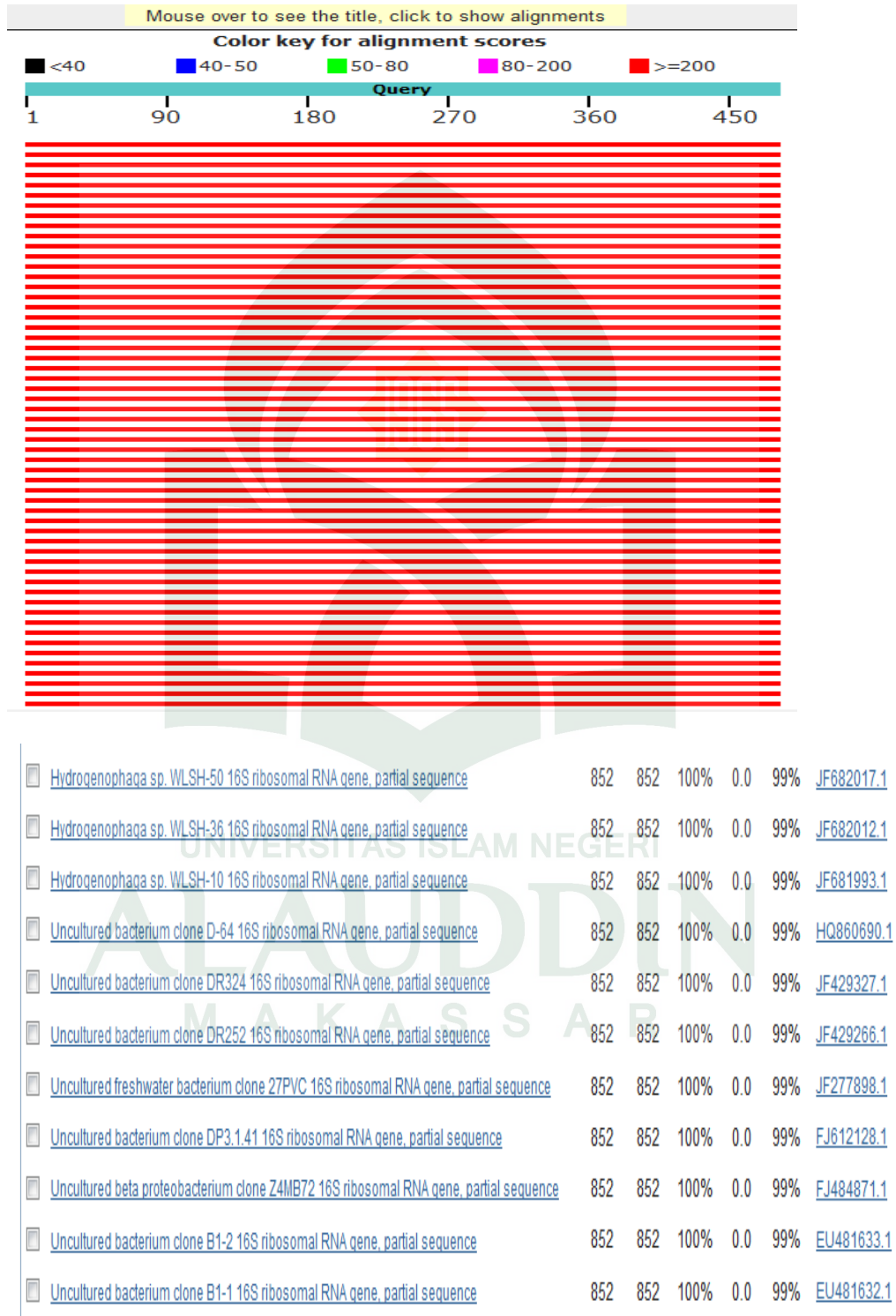
Sequence ID: [KM461977.1](#) Length: 1487 Number of Matches: 1

Range 1: 595 to 943 [GenBank](#) [Graphics](#)

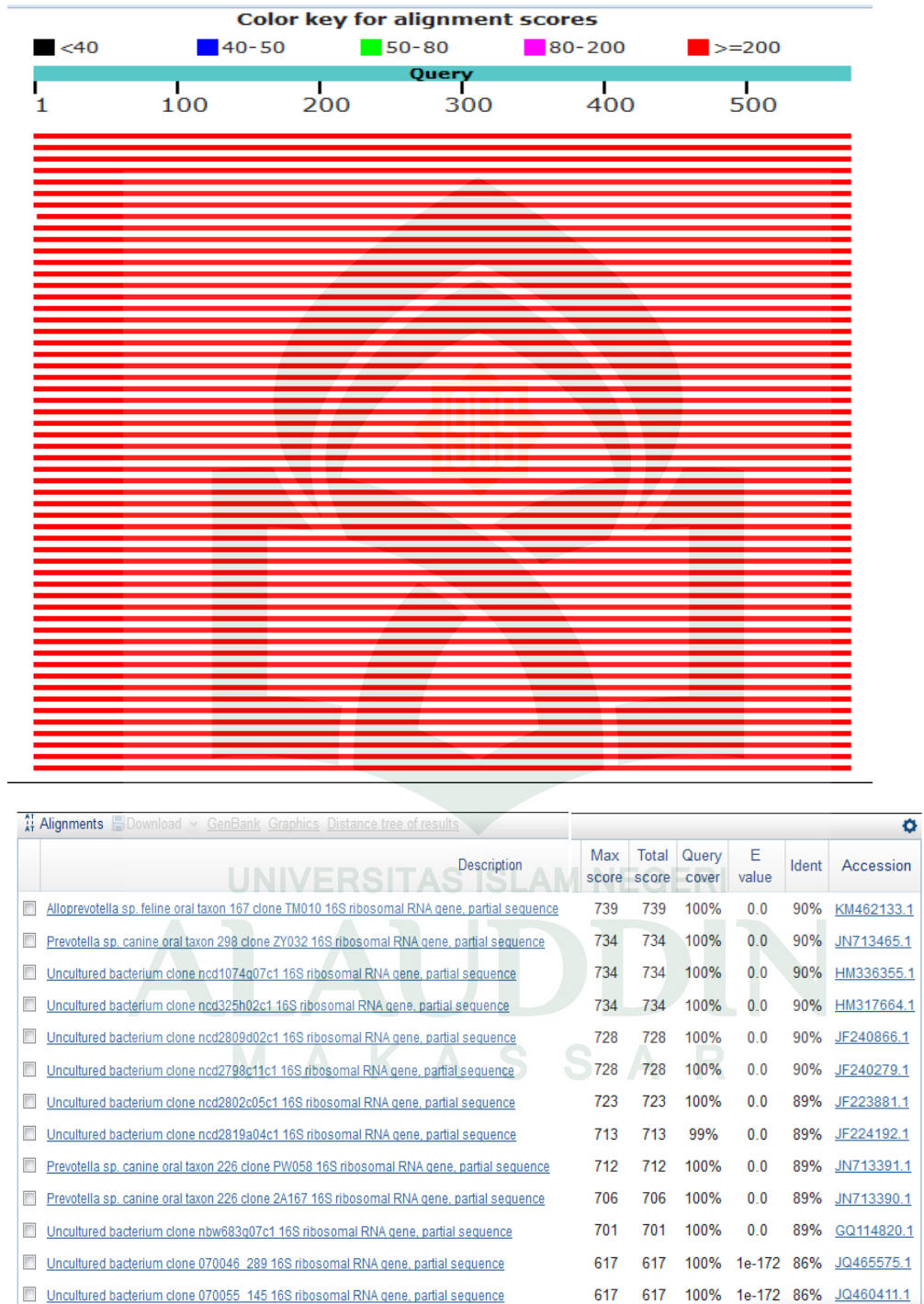
▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
496 bits(268)	3e-136	322/349(92%)	0/349(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTGAAAGCCTGCGGCTTAACTGGGGAAC	TGCCTTTGATACTGGCGATCTTGAGTGTATTT	60	
Sbjct 595	GTGAAAGCCTGCGGCTTAACTGTAGAACTGCCGTTGATACTGTCGGTCTTGAGTGTATTT	654		
Query 61	GAGGTAGGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGAGTAGGAATACCGAT	120		
Sbjct 655	GAGGTAGCTGGAATGAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTCAGAACACCAAT	714		
Query 121	TGCGAAGGCAGGCTACTGGGTTACTACTGACGCTCATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAAC	180		
Sbjct 715	TGCGAAGGCAGGTTACCAAGTTACAACTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAAC	774		
Query 181	AGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGGTATTA	240		
Sbjct 775	AGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGCTAACTCGTTTTTGGGGTATTA	834		
Query 241	TACTTCATAGACCAAGCGAAAGTGATAAATTAGCCCCCTGGGGAGTACGAACGCAAGTTT	300		
Sbjct 835	TACTTCAGAGACCAAGCGAAAGTGATAAGTTAGCCACCTGGGGAGTACGAACGCAAGTTT	894		
Query 301	GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGATAATGTGG	349		
Sbjct 895	GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGATTATGTGG	943		

- Hasil Sekuensing Sampel Air Liur Murni (NCA)



- Hasil Sekuensing Sampel Swab (NCB)



Range 1: 701 to 1333				GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score		Expect	Identities	Gaps	Strand		
987 bits(534)		0.0	600/635(94%)	5/635(0%)	Plus/Plus		
Query	2	AAGGC-GGTGTCCGGGGTGTACTGGAC-CTGANGCTCGAAAGTGTGGGTATCCAAACAG			59		
Sbjct	701	AAGGCAGGTGTCCGGGGTGTACTG-ACGCTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAT-CAAACAG			758		
Query	60	GATTAAATCCCCGGGTA-TcccccccGTAAAAACAAGGATACTCGGAGTTTGGGATATACT			118		
Sbjct	759	GATTAGATACCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATGTATACTCGTAGTTTGCATAGACT			818		
Query	119	GTAAGCTACCAAGCGAAAGCATTAAAGTATACCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAA			178		
Sbjct	819	GTAAGCTACCAAGCGAAAGCATTAAAGTATACCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAA			878		
Query	179	ACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCCAAACGGAGGAACATGTGGTTTAATTTCGATGAT			238		
Sbjct	879	ACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTTCGATGAT			938		
Query	239	ACCCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAGTAGACAGGACAGACCAAGAAATTGGTTTTTCT			298		
Sbjct	939	ACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAGTAGACAGGACAGACCAAGAGATTGGTTTTTCT			998		
Query	299	TCCGACCTGTTTACAGGTGCTGCAIGGTTGTCGTGAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTT			358		
Sbjct	999	TCCGACCTGTTTACAGGTGCTGCAIGGTTGTCGTGAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTT			1058		
Query	359	AAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTTCTCCTCGGTTGCCATCAGGTGATGCTGGGCACTCC			418		
Sbjct	1059	AAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTTCTCCTCGGTTGCCATCAGGTGATGCTGGGCACTCC			1118		
Query	419	GTGGACACTGCCATCGTAAGATGTGAGGAAAGTGGGGATGACATCAAATCAGCACGGCCC			478		
Sbjct	1119	GTGGACACTGCCATCGTAAGATGTGAGGAAAGTGGGGATGACATCAAATCAGCACGGCCC			1178		
Query	479	TTACNTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGTACAGAGGTGCTACCTGGTGAC			538		
Sbjct	1179	TTACNTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGTACAGAGGTGCTACCTGGTGAC			1238		
Query	539	AGGATGCTAATCTCGAAAACCTCTCTCCTCGGATTGGAGTCTGCAACCCGACTCCNTG			598		
Sbjct	1239	AGGATGCTAATCTCGAAAACCTCTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACCCGACTCCATG			1298		
Query	599	AANCTGGATTGCTAGTAATCGCGCATCNACCATG	633				
Sbjct	1299	AAGCTGGATTGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATG	1333				

RIWAYAT HIDUP



NIRWANA atau biasa dipanggil ANHA, lahir di MAROS, 28 Agustus 1996. Lahir sebagai anak pertama dari dua bersaudara, dari pasangan ayah tegas yang bernama, M.ANAR dan ibu penyayang yang bernama NURBAYA. Semasa kecilnya ia habiskan di desa tempat kelahirannya yang begitu indah dan nyaman. Pada tahun 2002, ia sudah menginjak bangku sekolah dasar di SD 28 ROMPEGADING. Pada tahun 2008 ia lulus SD dan melanjutkan di bangku SMPN 2 CENRANA. Lanjut pada tahun 2011 iapun selesai di tahap pendidikan SMP dan langsung melanjutkan ke jenjang yang lebih tinggi lagi yaitu SMA, tepatnya SMAN 12 CENRANA-MAROS. Dan pada tahun 2014 ia melanjutkan pendidikan di *UNIVERSITAS ISLAM NEGERI ALAUDDIN MAKASSAR* ke jenjang S1 pada jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi melalui jalur (SNM-PTN) Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri

Selama menjadi Mahasiswa Penulis aktif di organisasi ekstra-intra kampus. Kemudian penulis juga Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Rumah Sakit Pusat Universitas Hasanuddin serta Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Bonto Majannang Kec. Sinoa Kab. Bantaeng. Terakhir penulis membuat skripsi dengan judul “Identifikasi Molekuler Bakteri Pada Saliva Anjing Dewasa (*Canis lupus*) Ras Herder Dewasa”. Semoga segala ilmu yang diperoleh selama masa perkuliahan bermanfaat dan menjadi anak yang shaleh

serta sukses berkat bantuan dari orang tua tercinta dan semua yang ikut serta dalam masa pendidikan penulis. Penulis sangat bercita-cita untuk menjadi Ilmuan di bidang Biologi. Amin....

“sebaik-baik teman adalah yang membimbing kita menuju suatu kebaikan”

...SEKIAN...

